

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie

Karyotypová evoluce stepníkovitých pavouků (Araneae: Eresidae)

Karyotype evolution of velvet spiders (Araneae: Eresidae)

Martin Forman

V Pardubicích 2008

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Král, Dr.

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracoval sám, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucího práce.

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval svému školiteli Dr. Jiřímu Královi za odborné vedení práce, ing. Janě Musilové za odbornou asistenci a celému osazenstvu naší laboratoře za mnohou pomoc a vytvoření přátelského prostředí. Dr. Milanu Řezáčovi (VÚRV, Praha) jsem zavázán za determinaci a poskytnutí materiálu a mnoha informací o biologii stepníkovitých. Prof. RNDr. František Marec (ENTÚ AV ČR, České Budějovice) mi umožnil přípravu a pozorování FISH preparátů ve své laboratoři, Dr. Magdě Vítkové děkuji za pomoc při těchto experimentech. Dále bych rád poděkoval Doc. RNDr. Petrovi Burešovi (PřF MU, Brno), jež mi umožnil měřit obsahy DNA ve své laboratoři, a Mgr. Lucii Horové za pomoc při samotném měření. Dík patří i MUDr. Lukáši Kubalovi (Biofyzikální ústav AV ČR, Brno) za izolaci lidských leukocytů. Za dodání materiálu pro studium velmi děkuji kolegům Prof. Yael Lubin (Ben Gurionova Univerzita, BeerSheva, Izrael), Bc. Lence Dulíkové (PřF UK), Mgr. Věře Opatové (PřF UK), Dr. Františku Šťáhlavskému (PřF UK), Stanislavu Macíkovi (Zlín), Mgr. Janu Dolanskému (Muzeum Pardubice), Ing. Martinovi Jarabovi (PřF MU, Brno), Dr. Charlesovi Haddadovi (Univerzita v Bloemfonteinu, JAR), Dr. Sunishovi Ethaniel (Univerzita v Kelaře, Indie), Dr. Hishamovi El-Hennawy (Univerzita v Káhiře, Egypt) a již zmiňovaným J. Královi a M. Řezáčovi. Děkuji rovněž Ministerstvu životního prostředí za udělení výjimky pro sběr chráněných druhů stepníků. V neposlední řadě bych rád vyjádřil vděk své rodině a blízkým za psychickou i materiální podporu mé osoby.

Práce vznikla v letech 2006 až 2008 a byla podporována projektem Grantové agentury Akademie věd č. IAA 601 110 808 : „Karyotypová evoluce pavouků nadčeledí Eresoidea a Dysderoidea“.

## **Karyotype evolution of velvet spiders (Araneae: Eresidae)**

### **Summary**

Presented study is aimed to determine basic trends of karyotype evolution in velvet spiders (Eresidae; Araneae). Eresids are burrowing spiders; they includes also some social species. Karyotypes of 16 species of the family Eresidae as well as 2 species of the other families of the superfamily Eresoidea, Hersiliidae and Oecobiidae, are presented. Furthermore, DNA content and base proportion was determined in 14 species. In two species, DNA content of sex chromosomes was also measured. Obtained results revealed considerable variability of diploid numbers, and sex chromosomes systems in eresids. Obtained karyotype data allow to divide eresids into four groups. Karyotypes of the genera *Gandanameno*, *Dresserus* and *S. lineatus* are close to proposed ancestral karyotype of entelegynae spiders and they show the ancestral state of karyotype in velvet spiders. Karyotypes of *S. lineatus* and *E. annulipes* differ substantially from other representatives of the genera *Stegodyphus* and *Eresus* which indicates paraphyly of these genera. Karyotypes of basal forms are formed by acrocentric chromosomes. Further evolution of eresid karyotypes included considerable reduction of diploid numbers as well as changes of chromosome morphology. Social species of the genus *Stegodyphus* show tendency to reduce diploid numbers by translocations and tandem fusions. Moreover, social species *S. mimosarum* is in fact a complex of two closely related species.

**Klíčová slova:** Entelegynae, Eresidae, *Eresus*, evolve, karyotyp, obsah DNA, poměr bazí, pohlavní chromozomy, sociální pavouci, *Stegodyphus*

**Key words:** DNA content, Entelegynae, Eresidae, *Eresus*, GC/AT ratio, karyotype, sex chromosomes, social spiders, *Stegodyphus*

## **Slovník pojmů a seznam zkratk**

**BSA** - hovězí sérový albumin (z angl. bovin serum albumine), protein se širokým využitím v mol. biologických laboratořích, m.j. i blokátor mnoha reakcí (blokuje volná vazebná místa reaktantů)

**C pruh** – vizualizovaný usek konstitutivního heterochromatinu

**CV** – koeficient variability; parametr určující kvalitu histogramu při měření velikostí genomů, (žádoucí jsou jeho nízké hodnoty - pod 2 jsou považovány za velmi dobré)

**DAPI** – 4',6-diamidino-2-fenylindol; fluorescenční barvivo vážící se na DNA (přednostně na AT páry).

**DF\_DAPI** – (z angl. Dye factor) - tzv. faktor barviva DAPI užívaný v průtokové cytometrii při výpočtech zastoupení párů bazí v genomu; jedná se o poměr mezi násobkem obsahu DNA primárního standardu měřeným pomocí DAPI a násobkem obsahu DNA primárního standardu měřeným neselektivním barvivem (např. PI,)

**dNTP** – směs čtyř trifosfát nukleotidů (ATP, GTP, CTP, TTP)

**Entelegynní pavouci** – evolučně nejpokročilejší skupina pavouků; patří do ní většina čeledí. Skupina je definována podle utváření samičího kopulačního orgánu

**FCM** – zkratka pro průtokovou cytometrii

**FISH** – Fluorescenční in situ hybridizace

**Heteropyknóza** – odlišná barvitelnost, může být pozitivní (tj. tmavší) i negativní (tj. světlejší)

**Hodnota C** – obsah DNA v haploidní sadě organismu (nejčastěji udáván v pg)

**HOX geny** – homeotické geny, kódující důležité morfogeny mnohobuněčných organismů, jež podmiňují segmentaci zárodku v embryogenezi

**NOR** – (z angl. nucleolus organizer region) - nukleolární organizátor jadérka, část chromozomu, v níž se nachází geny pro rRNA (kromě genů pro 5S rRNA)

**Outgroup** – organismus nebo skupina organismů užívaná v evolučních analýzách. Nepatří do analyzované skupiny a slouží pro porovnání event. stanovení výchozího stavu u analyzované skupiny

**PBS** – pufr obsahující NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O

**PI** – propidium iodid; fluorescenční barvivo interkalující se do molekuly DNA, neváže se specificky na GC nebo AT páry bazí

**SSC** - tzv. SSC pufr (1 x SSC obsahuje 0,15 mol/l chloridu sodného, 0,015 mol/l citrátu sodného)

## Obsah

1 Úvod.....	9
2 Literární přehled.....	
2.1 Biologie stepníkovitých.....	
2.2 Úvod do biologie sociálních pavouků.....	
2.2.1 Vznik sociálního chování u pavouků a jeho klasifikace.....	
2.2.2 Biologie kvazicociálních pavouků.....	
2.2.3 Vybrané aspekty biologie rodu <i>Stegodyphus</i> .....	
2.3 Stručný přehled údajů o cytogenetice a genomech pavouků.....	
2.4 Cytogenetika sociálních bezobratlých se zvláštním zřetelem k pavoukům.....	
2.4.1 Změny karyotypu spjaté s evolucí sociality.....	
2.4.2 Cytogenetika sociálních pavouků.....	
2.5 Polyploidie u živočichů.....	
3 Materiál a metody.....	
3.1 Materiál.....	
3.2 Metody.....	
3.2.1 Zhotovení chromozomových preparátů.....	
3.2.2 Vizualizace konstitutivního heterochromatinu pomocí C pruhování.....	
3.3 Vizualizace NORů pomocí fluorescenční in situ hybridizace nepřímo značenou sondou.....	
3.4 Měření obsahu DNA.....	
4 Výsledky.....	
4.1 Karyotypy studovaných druhů.....	
4.1.1 Rod <i>Stegodyphus</i> .....	
4.1.2 Rod <i>Eresus</i> .....	
4.1.3 Ostatní zástupci čeledi Eresidae.....	
4.1.4 Ostatní Eresoidea.....	

4.2 Chování chromozomů v průběhu samčího meiotického dělení.....	44
4.3 Vizualizace nukleolárních organizátorů.....	48
4.4 Měření obsahu DNA a relativního zastoupení AT/GC párů v genomu.....	50
5 Diskuze.....	53
5.1 Základní charakteristika karyotypů a genomů nadčeledi Eresoidea.....	53
5.1.1 Základní charakteristika karyotypů čeledi Eresidae.....	53
5.1.2 Úvod do evoluce karyotypu čeledi Hersiliidae a Oecobiide.....	55
5.1.3 Základní charakteristika genomů nadčeledi Eresoidea.....	56
5.2 Rekonstrukce karyotypové evoluce čeledi Eresidae.....	57
5.2.1. Stanovení ancestrálního karyotypu čeledi.....	57
5.2.2 Další evoluce karyotypu stepníků.....	57
5.2.3 Zvyšování počtu chromozomů v rodech <i>Adonea</i> , <i>Dorceus</i> a <i>Eresus</i> .....	60
5.3 Další směry výzkumu.....	65
6 Souhrn.....	66
7 Seznam citované literatury.....	68



## 1 Úvod

Řád pavouci (Araneae) patří spolu s hmyzem do nejpočetnějšího živočišného kmene členovců (Arthropoda). Pavouci jsou však hmyzu příbuzní jen velmi vzdáleně, což se odráží v jejich řazení do odlišného podkmene - klepítkatců (Chelicerata). Klepítkatci jsou velmi diverzifikovanou a starobylou skupinou, která se objevila již v průběhu tzv. kambrické exploze ve spodním kambriu (PROKOP 1989). Pavouci patří spolu s roztoči a některými skupinami hmyzu k druhově nejpočetnějším řádům živočišné říše. Dosud bylo popsáno více než 40 000 druhů pavouků řazených do 108 čeledí (PLATNICK 2008). Pavouci se člení do třech hlavních evolučních větví, na sklípkoše (Mesothelae), sklípkaný (Mygalomorphae) a dvouplicné pavouky (Araneomorphae).

Z hlediska cytogenetiky jsou pavouci nejprostudovanější skupinou klepítkatců. Byly popsány karyotypy asi 600 druhů pavouků (KRÁL seznam karyotypovaných druhů). I když od publikace prvních údajů o chromozomech pavouků uběhlo více než sto let (CARNOY 1885), údaje o cytogenetice a karyotypech řady skupin pavouků chybí nebo jsou nedostatečné. Pavouci jsou z karyotypového hlediska značně diverzifikovanou skupinou, všichni mají dobře vyvinuté pohlavní chromozomy. Cílem mé diplomové práce bylo zmapovat trendy karyotypové evoluce u stepníkovitých pavouků (Eresidae). Čeleď Eresidae zahrnuje 101 druhů v deseti rodech (PLATNICK 2008). Karyotypy stepníkovitých byly doposud publikovány pouze u třech druhů rodu *Stegodyphus* (SHARMA a SINGH 1957, MITTAL 1970, AVILÉS *et al.* 1999). V diplomové práci jsem navázal na svou bakalářskou práci, ve které jsem popsal karyotypy třech zástupců rodu *Stegodyphus*: *S. africanus*, *S. mimosarum* a *S. sarasinorum*.

Informace o chromozomech stepníkovitých by mohly být zajímavé hned z několika důvodů. Vzhledem k tomu že se jedná se o poměrně primitivní skupinu araneomorfních pavouků, mohly by poznatky o jejich karyotypech přispět k rekonstrukci ancestrálního karyotypu araneomorfních pavouků. Značný význam by mohly mít i poznatky o karyotypech zástupců rodu *Stegodyphus*, mezi nimiž se vyskytují sociální druhy. Všeobecně známými bezobratlými živočichy se sociálním chováním jsou některé skupiny blanokřídlého hmyzu a vřekazi, sociální druhy se však vzácně vyskytují i v jiných skupinách, např. u pavouků. Výzkumy u hmyzu ukazují, že různé modifikace karyotypu (např. haplodiploidie) mohou sehrát významnou roli v evoluci sociálního chování (TRIVES a HARE 1976).

Dalším pozoruhodným fenoménem cytogenetiky stepníkovitých je extrémní diverzita diploidních počtů, kterou jsme objevili v naší laboratoři a na níž se mohly podílet polyploidizace. Incidence polyploidie je u živočichů velmi nízká, jako jeden z důvodů je uváděno narušení poměru mezi pohlavními chromozomy a autozomy (MÜLLER 1925). Prokázání výskytu polyploidie u skupiny s diverzifikovanými pohlavními chromozomy by mohlo vést k přehodnocení tohoto tradičního biologického dogmatu.

## **2.Literární přehled**

### **2.1 Biologie stepníkovitých a příbuzných skupin**

Araneomorfní pavouci obsahují dvě významné evoluční větve: původnější haplogynní a odvozenější entelegynní, která je nejpočetnější skupinou pavouků (CODDINGTON a LEVY 1991). Na bázi entelegynní větve se nachází nadčeleď Eresoidea, která je tvořena třemi čeleděmi: nákorníkovití (Hersiliidae), kruháčovití (Oecobiidae) a stepníkovití (Eresidae) (GRISWOLD *et al.* 1999).

Nákorníkovití jsou řazeni do 11 rodů o 157 druzích. Žijí pod kameny a na kůře stromů (BAEHR a BAEHR 1993). Čeleď kruháčovitých má 105 druhů v šesti rodech. Tito pavouci si často budují pod kameny důmyslné pavučinové pasti pro polapení kořisti, několik druhů je i synantropních. Obě čeledi se vyskytují v teplejších oblastech, ze střední Evropy není znám žádný zástupce (PLATNICK 2008).

V čeledi stepníkovitých je k dnešnímu dni je známo 101 druhů řazených do 10 rodů (počty druhů jsou uvedeny v závorce): *Adonea* (1), *Dorceus* (5), *Dresserus* (24), *Eresus* (18), *Gandanameno* (5), *Paradonea* (4), *Penestomus* (2), *Seothyra* (13), *Stegodyphus* (21) a *Wajane* (2) (PLATNICK 2008). Pro rody *Penestomus* a *Wajane* je vyčleněna samostatná podčeleď Penestominae. V blízké budoucnosti lze očekávat popisy dalších druhů, např. v rodu *Eresus* (ŘEZÁČ připravováno). Centrum výskytu stepníkovitých je v Africe, Středomoří a na Blízkém Východě. Na východ zasahují nejdále do Barmy a Číny (YANG a HU 2002 in ŘEZÁČ *et al.* 2008). Rod *Eresus* zasahuje až do severní Evropy. Dva druhy rodu *Stegodyphus* jsou uváděny z Amazonie (KRAUS 1992), u jednoho z nich se však téměř s jistotou jedná o omyl vzniklý záměnou materiálu ze starších sběrů (ŘEZÁČ ústní sdělení). V České republice žijí tři zástupci rodu *Eresus*: *E. kollari*, *E. moravicus* a *E. sandaliatus* s odlišnou fenologií (ŘEZÁČ 2008). Jedná se o příbuzné druhy, které byly ještě nedávno řazeny do jednoho druhu *E. cinnaberinus* (BUCHAR a RŮŽIČKA 2002).

Zástupci čeledi Eresidae a někteří zástupci čeledi Oecodiidae se vyznačují přítomností kribela. Jedná se o jemné sítko umístěné před snovacími bradavkami, z kterého tyto pavouci vyčesávají pomocí hřebínku na čtvrtém páru nohou (kalamistra) velmi jemné pavučinové vlášení. Tímto vlášením pak obalují vlastní nosná vlákna sítě. Takové mechanické lapací zařízení může být efektivnější než kapénky lepu, které nalézáme v sítích některých skupin pavouků bez kribela (BUCHAR a KŮRKA 2001).

Jak napovídá český název, stepníkovití obývají suchá a teplá stanoviště od stepí až po písčité pouště (EL HENNAWY 2002). Díky morfologickým a fyziologickým adaptacím nemusí pít a vystačí s vodou obsaženou v potravě (SEIBT a WICKLER 1990). Mají-li však možnost, pijí i vodu (SEIBT a WICKLER 1988a, vlastní pozorování). Všichni stepníci mají vyvinutou mateřskou péči, projevující se setrváváním mláďat s matkou a regurgitací (krmení natrávenou potravou). Mateřská péče vrcholí matrifágií, tedy pozřením matky. Mimo rodu *Stegodyphus* si všichni stepníci budují podzemní nory, což značně znesnadňuje studium jejich biologie. Dospělí samci jsou často výrazně zbarveni, opouštějí nory a vyhledávají několikanásobně větší samičku. V ekosystémech zaujímají stepníci důležitou funkci predátorů různých bezobratlých. Sami jsou ohrožováni zejména mravenci a ptáky (HENSCH 1998). Jed stepníků bývá považován za neškodný pro člověka (JOCQUÉ a DIPPENAR-SCHOEMAN 2006). Ukazuje se, že jed stepníků může být dosti účinný, v důsledku skrytého způsobu života však nedochází k častým kontaktům stepníků s lidmi (ŘEZÁČ osobní komunikace).

Rod *Stegodyphus* jako jediný z čeledi neobývá nory, nýbrž si staví hnízda ve větvích keřů a stromů. Na rozdíl od terestrických druhů čeledi Eresidae se těší rod *Stegodyphus* relativně velké pozornosti arachnologů, jeho biologie je prostudována zdaleka nejlépe z celé čeledi. Důvodem tohoto zájmu je přítomnost sociálních druhů, které skýtají mnohá atraktivní témata k výzkumu.

## 2.2 Úvod do biologie sociálních pavouků

### 2.2.1 Vznik sociálního chování u pavouků a jeho klasifikace

Pavouci jsou primárně predátoři, kteří loví svou kořist soliterně, nezřídka projevují i kanibalismus. Přesto se v jejich životním cyklu objevují období, kdy je výhodné potlačit agresivní chování. Dočasná agregace např. v době hibernace nebo po vylíhnutí je známá u mnoha skupin třídy pavoukovců (Arachnida) (BUSKIRK 1981, MACHADO a VASCONCELOS 1998, RAYLOR a TAYLOR 2008), největšího rozvoje dosáhlo sociální chování u pavouků.

Pavouci vykazují různé úrovně sociality, od agregací jednotlivých sítí až po společnou péči o potomstvo. Dnes nejuznávanější klasifikaci sociálních interakcí mezi pavouky publikovala AVILÉS (1997), jež dělí společenské pavouky do čtyř skupin. Pro účely studia rodu *Stegodyphus* postačí uvést dvě z nich: 1) neteritoriální, periodicky sociální druhy (tzv. subsociální, WILSON 1971) a 2) neteritoriální, permanentně sociální (tzv. kvazisociální nebo sociální, WILSON 1971) druhy. Obě skupiny neteritoriálně sociálních pavouků, obývají společně jednu velkou pavučinu. Zatímco permanentně sociální druhy tvoří několik generací trvající kolonie. Životní cyklus periodicky sociálních druhů zahrnuje různě dlouhé období společného života, které však končí nejpozději dosažením dospělosti, poté žijí jedinci soliterně. Mláďata setrvávají s matkou a tvoří základ nové kolonie. Subsociálnost lze tedy považovat za prodlouženou mateřskou péči a evoluční předstupeň permanentní sociality (BUSKIRK 1981).

Ke vzniku kvazisociality došlo nezávisle u šesti pavoučích čeledí (AVILÉS 1997). AGNARSON (2008, <http://theridiidae.com>) udává 22 druhů kvazisociálních pavouků (tab. 1). Ve třech čeledích přitom došlo k opakovanému vzniku kvazisociality. U čtvrté nejpočetnější pavoučí čeledi snovačkovitých (Theridiidae) vznikla kvazisocialita minimálně šestkrát ve třech rodech (AGNARSSON 2005), u stepníků (Eresidae) třikrát (KRAUS a KRAUS 1988) a u cediveček (Dictynidae) dvakrát (AVILÉS 1993). Kvazisociální pavouky lze nalézt v teplých oblastech celého světa. Ve všech případech předcházely evoluci kvazisociality druhy subsociální (AVILÉS 1997). Nezávislé a opakované vzniky sociality jsou výhodné při studiu fenoménů spjatých s evolucí permanentní sociality.

Čeľed'	Druh	Velikost kolonie (počet jedinců)	Poměr pohlaví (%samců)	Rozšíření
Agelenidae	<i>Agelena consociata</i>	2 000	8%,13%	Gabun
	<i>Agelena republicana</i>	desítky	19%	Gabun
Dictynidae	<i>Aebutina binotata</i>	800	8%	Ekvádor, Brazílie
	<i>Mallos gregalis</i>	20 000	13%	Mexiko
Eresidae	<i>Stegodyphus dumicola</i>	700	17%	stř. a již. Afrika
	<i>Stegodyphus mimosarum</i>	400	9,70%	stř. a již. Afrika, Madagaskar
	<i>Stegodyphus sarasinorum</i>	900	22%	Indie, Nepál, Srí Lanka
Nesticidae	neurčený druh	?	?	Kolumbie
Oxyopidae	<i>Tapinillus</i> sp.	700	50% *	Ekvádor
Theridiidae	<i>Achaearanea disparata</i>	100	?	Gabun, Cote d'Ivoire
	<i>Achaearanea verwoorti</i>	stovky	0,4%, 14%	Nová Guinea
	<i>Achaearanea wau</i>	1 800	11%	Nová Guinea
	<i>Anelosimus domingo</i>	1 000	8%	Peru, Kolumbie až Surinam,
	<i>Anelosimus eximus</i>	50 000	9%	Panama až Argentina
	<i>Anelosimus guacamayos</i>	?	?	Ekvádor
	<i>Anelosimus lorenzo</i>	200	?	Panama, Brazílie, Argentina
	<i>Anelosimus oritoyacu</i>	?	?	Mexiko až Ekvádor
	<i>Anelosimus puravida</i>	?	?	Guatemala až Panama
	<i>Anelosimus rupununi</i>	1 000	?	Trinidad až Brazílie
	<i>Theridion nigroannulatum</i>	4 000	13%	Peru
Sparassidae	<i>Delena cancerides</i>	300	50%	Austrálie, Tasmánie

Tab. 1: Seznam kvazisociálních pavouků se známými údaji o početnosti kolonií, poměrech pohlaví a geografickém výskytu. Detailnější údaje o biologii některých druhů nejsou známy. \* - Poměr pohlaví v kokonu se stářím kolonie se mění ve prospěch samic (AVILÉS 1997, upraveno podle: AGNARSSON 2008 - <http://theridiidae.com>).

### 2.2.2 Biologie kvazisociálních pavouků

Biologie kvazisociálních pavouků se vyznačuje některými zvláštními rysy, které však nelze zevšeobecňovat na všechny druhy. Pod sociálními bezobratlými si člověk představí nejspíše společenstva blanokřídlých či termitů. Jakkoliv může kolonie kvazisociálních pavouků něco takového evokovat, je zde několik důležitých rozdílů dokazujících, že evoluce sociality u pavouků probíhala odlišným způsobem než u hmyzu (DARCHEN a

DARCHEN 1986). V pavoučích koloniích neexistuje žádná analogie královny. Nejsou zde sterilní jedinci, neexistují žádné morfologicky rozrůzněné kasty jako vojáci či dělnice. Všichni jedinci v kolonii vykonávají stejné činnosti a nebyla zaznamenána žádná dělba práce kromě té, jež je založena na pohlaví či věku. Samci se obvykle méně účastní společných aktivit a mláďata přidávají do svého chování nové aktivity úměrně svému věku (AVILÉS 1993, LUBIN 1995).

Pavoučí kolonie mohou být velmi početné (tab. 1) a zahrnovat i několik desítek tisíc jedinců, kteří spolupracují při stavbě sítí, lovu a péči o potomstvo. U početných kolonií je pavučinou obaleno i několik stromů. Kolonie bývá založena oplodněnou samicí a její potomci tvoří základ pro budoucí „pavoučí stát“ (BUSKIRK 1981). Další možností vzniku nové kolonie je rozpad mateřské kolonie hromadnou migrací více jedinců (LUBIN a ROBINSON 1982). Migrace cizích jedinců do kolonií jsou většinou tolerovány, i když existují i údaje o rozpoznávání jedinců vlastní kolonie (BURGESS 1976). Podle molekulárních analýz však imigranti neovlivňují výrazněji genotypové složení kolonie. I přes občasné migrace vykazují jednotlivé kolonie vysoký podíl inbreedingu, který vede ke snižování genotypové variability kolonie (REICHERT a ROELOFFS 1993). Evoluce sociality je podporována působením příbuzenské (kin) selekce (HAMILTON 1964), přičemž sociálně žijící jedinci zvyšují svou inkluzivní zdatnost tím, že pomáhají příbuzným členům kolonie. Genotypová podobnost jedinců v koloniích kvazisociálních pavouků a genotypová rozdílnost kolonií (REICHERT a ROELOFFS 1993) vede k debatám o působení skupinové (dem) selekce jako hnací síly v evoluci kvazisociality pavouků (AVILÉS 1993). V případě skupinové selekce je jednotkou, na níž působí přírodní výběr, celá subpopulace příbuzných jedinců – dema.

Skupinovou selekcí bývá vysvětlován také pozoruhodný fenomén vychýleného poměru pohlaví u kvazisociálních pavouků (AVILÉS 1993). Sociální pavouci vykazují na rozdíl od mnoha jiných gonochoristů s pohlavními chromozomy výrazné odchylky od Fisherova principu, podle kterého je u gonochoristů ideální poměr samců a samic 1:1. U kvazisociálních pavouků bývá výrazně nižší zastoupení samců (tab. 1). Při analýze kokonů u stepníka *Stegodyphus dumicola* (AVILÉS *et al.* 1999) a několika druhů snovaček rodu *Anelosimus* (AVILÉS a MADDISON 1991) byl vychýlený poměr pohlaví zjištěn již u embryí. Obě pohlaví pavouků se liší počtem pohlavních chromozomů, elegantní metodou určení primárního poměru pohlaví (poměru pohlaví v kokonu) je proto analýza karyotypu embryí. Spermie, které u pavouků rozhodují o pohlaví potomka (heterogametickým

pohlavím je samec), vznikají v meioze kvazisociálních pavouků v poměru 1:1 (např. AVILÉS *et al.* 2000). Nejpravděpodobnějšími možnostmi ovlivnění poměru pohlaví jsou tak nižší životnost gamet určujících samce či selekce spermií při oplození. Mechanismus vychýlení primárního poměru pohlaví zůstává dosud neznámý.

Výjimku mezi kvazisociálními pavouky představuje australská maloočka *Delena cancerides* (Sparassidae) s poměrem samic a samců 1:1. I když *Delena* vykazuje extrémní agresivitu vůči jedincům cizích kolonií (bylo zjištěno rozpoznávání členů vlastních kolonie, pravděpodobně pomocí specifického pachu; ROWELL a AVILÉS 1995), molekulární analýza prokázala, že u ní nedochází k výraznému inbreedingu (ROWELL 1990). Jinými kvazisociálními pavouky bez vychýleného primárního poměru pohlaví jsou paslídáci rodu *Tapinillus* (tab. 1), starší kolonie ale již obsahují výrazně menší podíl samců (AVILÉS 1994). Je zajímavé, že se vychýlení poměru pohlaví nevyskytuje u drtivé většiny subsociálních neteritoriálních druhů, jež jsou považovány za sesterské nebo ancestrální druhům kvazisociálním (AVILÉS a MADDISON 1991). Přesto bylo vychýlení primárního poměru pohlaví zjištěno i u některých subsociálních pavouků. Jedná se o tři druhy běžníků rodu *Diaea* (Thomisidae) (ROWELL a MAIN 1992), tedy zástupce čeledi, u níž není znám žádný případ permanentní sociality. To činí z těchto běžníků žhavé kandidáty na vznik permanentní sociality.

Pozoruhodným fenoménem biologie kvazisociálních pavouků je krátká životnost kolonií (VENTICIQUE *et al.* 1993). Kolonie obvykle přetrvávají jen několik generací. V průběhu růstu kolonie dochází k opakovaným migracím větších skupin pavouků nebo oplodněných samic. Tito migranti zakládají nové kolonie, které jsou často velmi vzdálené od mateřské kolonie (JOHANNESSEN *et al.* 2002). Krátká životnost kolonií bývá přisuzována nízké genotypové variabilitě členů kolonie zapříčiněné inbreedingem (LUBIN A BILDE 2008). Nízká genotypová variabilita způsobuje snížený adaptační potenciál. Nově založená kolonie je již „předurčena“ k zániku a jedinou šancí na zachování rodu je včasná migrace a založení nové kolonie (LUBIN A BILDE 2008).

Důležitou roli v životě pavouků hraje schopnost produkovat několik typů pavučinových vláken používaných k nejrozličnějším účelům, např. pro budování úkrytů, stavbu kokonu či lov kořisti. Tvorba sítě hrála důležitou roli také při vzniku kvazisociality (BUSKIRK 1981). Prostředí pavučiny je důležité pro rozeznání druhové příslušnosti a při vzájemné komunikaci mezi jedinci, a to díky vibraci vláken. I u čeledi, které si sítě k lovu nebudují a jejichž zástupci se pohybují volně a loví skokem, dochází ke vzniku sociality přednostně u

rodů, jež si vytváří jako jediné síť. Příkladem mohou být již zmiňovaní jihoameričtí paslídáci rodu *Tapinillus* (AVILÉS 1994) a subsociální běžníci rodu *Diaea* (MAIN 1988). Jediným kvazisociálním pavoukem, který se obejde bez sítí, je maloočka *Delena cancerides*. Komunikaci prostřednictvím vibrací pavučiny zde nahradil vzájemný kontakt končetinami mezi jedinci (ROWELL a AVILÉS 1995).

### 2.2.3 Vybrané aspekty biologie rodu *Stegodyphus*

Ke vzniku kvazisociality došlo u stepníků pouze v rodu *Stegodyphus*. Rod *Stegodyphus* zahrnuje v současnosti 19 druhů (KRAUS a KRAUS 1988, 1992, SLILIWAL *et al* 2005). Rod *Stegodyphus* je členěn podle morfologických znaků do třech druhových skupin (tab. 2), které jsou považovány za monofyletické linie (KRAUS a KRAUS 1988).

Druhová skupina	Subsociální druhy	Kvazisociální druh
<i>S. africanus</i>	<i>S. africanus, hildebrandti, sabulosus, lineifrons, tingelin, simplicifrons, duodimidiavittatus</i>	<i>S. mimosarum</i>
<i>S. dufouri</i>	<i>S. pacificus, dufouri, bicolor, manicatus, manaus*</i>	<i>S. sarasinorum</i>
<i>S. miradus</i>	<i>S. mirandus, tibialis, nathistmus, lineatus, tentoriicola</i>	<i>S. dumicola</i>

Tab 2. Rozdělení rodu *Stegodyphus* do třech druhových skupin považovaných za monofyletické. Rozdělení provedeno zejména na základě morfologie bulbů (podle KRAUS a KRAUS 1988, 1992 upraveno)

\**S. manaus* vykazuje morfologické znaky typické pro kvazisociální druhy, jeho však biologie nebyla prozkoumána.

V každé skupině je jeden kvazisociální druh, ostatní jsou subsociální. Jak potvrzuje morfologická (KRAUS & KRAUS 1988) i molekulární fylogeneze (JOHANNESSEN *et al.* 2007), ke vzniku kvazisociality došlo u rodu *Stegodyphus* třikrát nezávisle na sobě. To činí z rodu *Stegodyphus* vhodnou modelovou skupinu ke sledování evolučních změn, které jsou spjaty s přechodem od subsociality k permanentní socialitě. Diskutabilní je kvazisocialita u druhu *Stegodyphus manaus*. Kraus a Kraus (1992) u něj uvádějí morfologické znaky typické pro kvazisociální druhy rodu, biologie tohoto druhu nebyla doposud prozkoumána, a proto nelze o jeho socialitě říci nic s určitostí. Je však pravděpodobné, že sociálních druhů v rodu bude více, než se doposud předpokládalo. Naše i publikované chromozomové údaje svědčí o tom, že kvazisociální druhy jsou ve skutečnosti komplexem několika



kryptických druhů (viz. diskuze str. 60). Biologie mnoha subsociálních druhů je navíc nedostatečně prozkoumána a nelze vyloučit nové objevy kvazisociality.

Pavučinová obydlí rodu *Stegodyphus* jsou tvořena hustou pavučinou sloužící pavoukům jako úkryt, skladiště potravy a místo, kde vychovávají mláďata (SIEBT a WICKLER 1988b). Z této centrální části kolonie vychází trojrozměrná síť vláken sloužících k lapání kořisti. U sociálních druhů mohou tato vlákna spojovat sousední kolonie vznikající rozpadem mateřské kolonie.

Velké nebezpečí pro kolonie kvazisociálních druhů představují plísňe, které se rozrůstají na starších koloniích (HENSCHER 1998). Plísňe jsou tak jednou z hlavních příčin nutnosti zakládat nové kolonie. I u kvazisociálních druhů lze nalézt mnoho soliterně žijících jedinců, vždy se však jedná o dospělé samice. Migrace oplozených samic se uskutečňuje aeronautickým způsobem, který se v odborné literatuře označuje jako *ballooning* (HENSCHER *et al.* 1995). Při ballooningu pavouk nevyužívá k transportu horizontálního proudění vzduchu jako u běžného aeronautického chování pavouků, ale vyčkává na lokální stoupavé proudy, které se vyskytují za horkých dnů. Když uvážíme velikost dospělé samice (délka těla cca 2cm), nelze se divit pochybnostem o používání tohoto typu transportu (HENSCHER *et al.* 1995). Vznesení adultních samic však bylo opakovaně pozorováno (např. SCHNEIDER *et al.* 2001). Vzlet může být usnadněn produkcí kribelových vláken, které mohou zvětšit povrch, na který působí stoupající proud vzduchu (SCHNEIDER *et al.* 2001).

Kvazisociální druhy rodu *Stegodyphus* tolerují ve svých hnízdech nejen jedince z jiných kolonií, ale i jedince cizích druhů. V laboratorních podmínkách tak byly chovány společně dva kvazisociální druhy, *S. dumincola* a *S. mimosarum* (SEIBT a WICKLER 1988b). Vzhledem k tomu, že tyto druhy mají část areálu společnou, nabízí se možnost výskytu společných kolonií i v přírodě. Ty však nebyly nikdy pozorovány, oba druhy mají totiž mírně odlišné ekologické nároky. *S. mimosarum* si staví hnízda vysoko v korunách, přičemž *S. dumincola* si své pavučiny spřádá v nižších stromových patrech. V přírodě byla pozorována přítomnost subsociálních druhů *S. africanus* a *S. sabulosus* v sítích kvazisociálních zástupců. Vzájemná tolerance byla potvrzena též laboratorně (SEIBT a WICKLER 1998). V přirozeném prostředí byl pozorován kleptoparazitismus (tj. krádeže ulovené kořisti) a predace na hostitelském druhu (SEIBT a WICKLER 1988a).

Trvání jedné generace kvazisociálních stepníků je přibližně rok. Samice, které nestačí do dosažení pohlavní dospělosti nashromáždit dostatek energie na snůšku, fungují jako tzv. pomocnice (*helpers*). Pomáhají ostatním členům kolonie chránit mláďata, a nakonec se stanou potravou cizích potomků (LUBIN a SALOMON 2004). Díky vysoké míře inbreedingu slouží i takto svým vlastním genům, přenášeným mláďaty svých příbuzných. Tím že se nepáří, snižují také vychýlený poměr pohlaví (LUBIN A BILDE 2008).

Při experimentech s výměnou potomků nebylo u subsociálních stepníků zjištěno rozpoznávání vlastních potomků (SCHNEIDER 2002), jež bylo prokázáno u subsociálních běžníků druhu *Diaea ergandos* (EVANS 1998). Samice se staraly o cizí mláďata pouze tehdy, když byly v odpovídajícím fyziologickém stavu, tj. pokud měly mladé. To se považuje za překážku pro vznik pomocnic u subsociálních druhů. K jejímu překonání došlo až se vznikem kvazisociality (SCHNEIDER 2002). U *S. dumicola* bylo pozorováno, že se obrany kokonů účastní i někteří samci. Je to vůbec první případ, kdy byla u pavouků zaznamenána biparentální péče o potomstvo. Dospělí samci *S. dumicola* volí jednu ze dvou reprodukčních strategií: páří se buď jen s jedinou samicí, které pak pomáhají s rodičovskými povinnostmi, nebo s více samicemi, přičemž mohou migrovat do blízkých kolonií (KÜPRICK 2000).

### 2.3 Stručný přehled údajů o cytogenetice a genomech pavouků

V současnosti jsou známy karyotypy přibližně 600 druhů pavouků, což představuje asi 2 % popsaných druhů (KRÁL, přehled karyotypovaných pavouků). Nejprostudovanějšími pavouky jsou zástupci entelegynní větve araneomorfních pavouků (ŘEZÁČ *et al.* 2006), karyotypy ostatních skupin jsou známy velmi málo (ŘEZÁČ *et al.* 2006, KRÁL *et al.* 2007, ARAÚJO *et al.* 2008). Diverzita pavouků se odráží i v rozmanitosti jejich karyotypů. Diploidní počty chromozomů kolísají v širokém rozmezí, a to od 7 (*Ariadna lateralis*, Segesteridae) (SUZUKI 1954) do 128 (*Cyclocosmia siamensis*, Ctenizidae) (DULÍKOVÁ a KRÁL 2007). Průměrný počet chromozomů u pavouků je 28 (GOWAN 1985). Obecně platí, že vyšší počty chromozomů nalézáme u primitivních pavouků, tedy u skupin Mesothelae a Mygalomorphae (SUZUKI 1954). Velmi rozmanitá je i morfologie chromozomů. Karyotypy zástupců entelegynní větve jsou tvořeny většinou jen akrocentrickými chromozomy (SHARMA *et al.* 1959). V karyotypech ostatních skupin převažují naopak dvouramenné chromozomy (ŘEZÁČ *et al.* 2006, KRÁL *et al.* 2007). Karyotypy primitivních araneomorfních pavouků nadčeledi Dysderoidea jsou tvořeny

holocentrickými chromozomy (KRÁL *et al.* 2006). Variabilita diploidního počtu chromozomů v rámci rodu je až na výjimky (BOLE-GOWDA 1952, ROWELL 1985, ŘEZÁČ *et al.* 2006, ARAÚJO *et al.* 2008, tato práce) obvykle nízká a u entelegynních pavouků je často přítomnost jednoho diploidního počtu dominantní v celé čeledi (ARAÚJO *et al.* 2005a).

Pavouci mají rozmanité systémy pohlavních chromozomů. U 77 % karyotypovaných druhů byl nalezen neobvyklý systém chromozomového určení pohlaví  $X_1X_20$  (ARAÚJO *et al.* 2005a). To znamená, že samci nesou dva nehomologické chromozomy X ( $X_1$  a  $X_2$ ) a samice dva páry chromozomů X ( $X_1X_1$  a  $X_2X_2$ ). Symbol 0 vyjadřuje absenci chromozomu Y. Tento systém byl nalezen též u některých lasturnatek, hmyzu a hlístic, a to jako odvozený (WHITE 1973). U pavouků je však pravděpodobně původní, neboť byl nalezen již u nejprimitivnějších známých pavouků - sklípkošů (Mesothelae) (SUZUKI 1954). Způsob vzniku systému  $X_1X_20$  u pavouků není dosud vyřešen. Nejčastěji se předpokládá nondisjunkce v systému  $X0$  s následným rozrůzněním obou chromozomů X (BRUM-ZORRILLA a POSTIGLIONI 1981). Druhou možností vzniku systému  $X_1X_20$  je rozpad původního metacentrického chromozomu X (PÄTAU 1948).

Ostatní systémy pohlavních chromozomů vznikaly většinou modifikacemi modu  $X_1X_20$ . Systémy s vyšším počtem chromozomů X vznikaly patrně opět nondisjunkcí (BRUM-ZORRILLA a POSTIGLIONI 1981). Systém  $X_1X_2X_30$  byl popsán u 9 % prozkoumaných druhů a systém  $X_1X_2X_3X_40$  byl doposud objeven pouze u třech druhů (DATTA a CHATTERJEE 1983). Systém  $X0$  popsán u 9 % zkoumaných druhů (ARAÚJO 2005) lze odvodit fúzí chromozomů  $X_1$  a  $X_2$  (KRÁL 1994b). Předběžné výsledky naší laboratoře ukazují, že u některých sklípkanů se objevují ještě složitější systémy pohlavních chromozomů s mnoha chromozomy X (DULÍKOVÁ a KRÁL 2007).

Systémy pohlavních chromozomů vznikající přestavbami mezi autozomy a pohlavními chromozomy (zahrnující tzv. neopohlavní chromozomy) se objevují častěji pouze u primitivních pavouků. U některých čeledí primitivních araneomorfních pavouků se vyskytuje systém  $X_1X_2Y$  s nepatrným chromozomem Y a neobvyklým způsobem párování (KRÁL *et al.* 2006). Neopohlavní systém XY sklípkanka *Atypus affinis* vznikl pravděpodobně fúzí mezi autozomy a pohlavním chromozomem v systému  $X0$ , který nacházíme u příbuzných druhů (ŘEZÁČ *et al.* 2006). U entelegynních pavouků se systémy zahrnující neopohlavní chromozomy objevují jen výjimečně. Jedná se např. o systém  $X_1X_2X_3Y$  severoamerických skákavek rodů *Habronattus* a *Evarcha* (Salticidae)

(MADDISON 1982) nebo systém  $X_1X_2X_3X_4X_5Y$  evropského pokoutníka *Malthonica ferruginea* (KRÁL 2001), který vznikl zakomponováním dvou chromozomových párů do systému  $X_1X_2X_30$  (KRÁL 2008).

U samců pavouků párují gonozomy v profázi prvního meiotického dělení nehomologicky na periférii jádra, přičemž vykazují v důsledku značné spiralizace tzv. pozitivní heteropyknózu (barví se více než ostatní chromozomový materiál) (SUZUKI 1954). V anafázi I putují chromozomy X společně ke stejnému pólu dělicího vřeténka.

Stejně jako u většiny bezobratlých se zatím nepodařilo ani u pavouků indukovat G nebo R pruhy, které by usnadnily identifikaci jednotlivých chromozomových párů. Konstitutivní heterochromatin je možno vizualizovat C pruhováním (SUMNER 1972). U pavouků je obvyklý pericentromerický pruh případně drobné telomerické bloky. Bloky konstitutivního heterochromatinu pavouků je dále možno charakterizovat s ohledem na převahu AT nebo GC párů fluorescenčním pruhováním (ARAÚJO *et al.* 2005). Sekvence v oblastech centromer ani telomer nejsou u pavouků známy. V telomerických oblastech se podařilo pouze vyloučit tzv. „hmyzí motiv“ (TTAGG) typický pro většinu členovců (VÍTKOVÁ *et al.* 2005).

Tradiční cytogenetickou technikou pro vizualizaci nukleolárního organizátoru (dále jen NOR) je detekce pomocí  $AgNO_3$ . Tato technika však umožňuje pouze vizualizaci NORů, které byly v předešlé interfázi transkribovány (MILLER *et al.* 1976). NORy se u pavouků obvykle nevyskytují na pohlavních chromozomech. U primitivních araneomorfních pavouků však byly NORy pozorovány i na pohlavním chromozomu (KRÁL *et al.* 2006). Přesnou představu o počtu a poloze NORů lze získat pomocí FISH. Vizualizace NORů pomocí FISH je u pavouků zatím v počátcích (KRÁL *et al.* připravováno, tato práce).

Velikosti genomu byly stanoveny u 115 druhů pavouků (GREGORY 2008). Mezi prozkoumanými druhy nebyl žádný zástupce nadčeledi Eresoidea. Rozsah hodnot C (haploidní velikost genomu) se pohybuje od 0,74 pg (čelistnatka *Tetragnatha elongata*, Tetragnathidae) do 5,7 pg (skákavka *Habronatus* sp., Salticidae). Průměrná hodnota C je 2,42 pg (GREGORY a SHORTHOUSE 2003). Údaje o obsahu DNA v pohlavních chromozomech pavouků a o poměru GC/AT v jejich genomech nebyly dosud publikovány.

## 2.4 Cytogenetika sociálních bezobratlých se zvláštním zřetelem k pavoukům

### 2.4.1 Změny karyotypu spjaté s evolucí sociality

Z genetického hlediska lze socialitu chápat jako zvyšování inkluzivní zdatnosti jedince šířením vlastních genů, které sdílí se svými příbuznými (HAMILTON 1964). U některých sociálních bezobratlých byly nalezeny zvláštní modifikace karyotypu, které mohou souviset s evolucí sociálního chování (TRIVES a HARE 1976, LACY 1980). Jedná se především o haplodiploidii u blanokřídlého hmyzu, která byla nalezena u všech studovaných zástupců tohoto řádu. Tento systém, u něhož jsou diploidní jen samice a samci jsou haploidní, je považován za predispozici ke vzniku sociality (TRIVES a HARE 1976). Dělnice je více příbuzná svým sestrám, než by byla svým potomkům, z evolučního hlediska je pro ni tedy výhodnější pečovat o svou matku a zvyšovat počet svých sester. Haplodiploidie se také vyskytuje u všech sociálních roztočů (MORI a SAITO 1997).

U termitů se dává do souvislosti se vznikem sociality tzv. komplexní translokační heterozygotnost, která je více než v živočišné říši známa u rostlin (např. *Oenothera*, *Rhoeo*, *Isotoma*) (JAMES 1965, CLELAND 1972). U některých rostlin je to jeden z mechanismů fixace heterozygotnosti. Při párování homologických chromozomů v profázi I dochází v důsledku mnohočetných reciprokových translokací ke vzniku chromozomových řetězců nebo prstenců. Následná segregace probíhá tak, že se chromozomy rozcházejí ve dvou komplexech (celý komplex se tak chová jako jeden chromozom). V řetězcích a prstencích je silně potlačena rekombinace, která se omezuje jen na distální úseky chromozomů. Homozygotní individua obdrží dva stejné komplexy a nevyvíjejí se. Je tomu tak v důsledku přítomnosti recesivních alel, které jsou v homozygotním stavu letální (CLELAND 1972). U živočichů není heterozygotnost zajištěna eliminací zárodků s homozygotní konstitucí, ale tím že se tvorby řetězců účastní pohlavní chromozomy (ROWELL 1985). Komplexní heterozygotnost u termitů bývá považována za analogii haplodiploidního systému blanokřídlých (LACY 1980). Při meióze heterogametického pohlaví obdrží gamety určující jedno pohlaví vždy stejný komplex pohlavních chromozomů na rozdíl od autozomových párů, které se rozcházejí náhodně. Tato skutečnost vede k tomu, že u sourozenců stejného pohlaví dochází ke snížení genotypové variability. U některých termitů byla translokacemi do systému pohlavních chromozomů začleněna značná část autozomů. U druhu *Kalotermea approximatus* bylo v karyotypu samce nalezeno 13 pohlavních chromozomů, přičemž diploidní počet chromozomů samce činí 33 (SYREN a LUYX 1981).

#### 2.4.2 Cytogenetika sociálních pavouků

U sociálních pavouků nebyla haplodiploidie zjištěna. Komplexní heterozygotnost byla zaznamenána jen u některých chromozomových ras australské maloočky *Delena cancerides* (Sparassidae). Původní samčí karyotyp australských malooček (studovány byly druhy *Pediana regina*, *Isopoda* spp., *Oliops* spp., *Heteropoda* spp.) se skládá ze 43 akrocentrických chromozomů. Je zde u pavouků méně obvyklý systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2X_30$ . U *D. cancerides* bylo nalezeno šestnáct chromozomových ras, čtrnáct z nich formuje jeden nebo více řetězců (SHARP a ROWEL 2007). Rasy označované tII (podle telocentrických resp. akrocentrických chromozomů) mají ancestrální karyotyp tvořený nefúzovanými akrocentrickými chromozomy. U ostatních ras došlo k centrickým fúzím téměř všech akrocentrických chromozomů a akrocentrický zůstal vždy jen jeden lichý chromozom. Centrické fúze probíhaly tedy v tomto případě podle pravidla „všechno nebo nic“, kdy fúzí všechny akrocentrické chromozomy (ROWEL 1987). Výsledný karyotyp samců se skládá z 21 metacentrických chromozomů a jednoho telocentrického chromozomu (ROWEL 1985). Fúzí se účastnily i gonozomy.

U rasy označované m (podle metacentrických chromozomů) dva z nich splynuly v metacentrický X, třetí chromozom X se fúze nezúčastnil a představuje zmíněný telocentrický chromozom. Rasy označované písmeny C (podle anglického chain - řetězec) jsou komplexními translokačními heterozygoty, translokacemi byly do sestavy jejich pohlavních chromozomů začleněny některé autozomy. V důsledku těchto translokací se u C ras tvoří v profázi I řetězce zahrnující 3 až 19 chromozomů. Vzhledem k přítomnosti pohlavního chromozomu v řetězci lze pohlížet na další chromozomy účastníci se tvorby řetězce jako na neopohlavní. Rasa C XIX má tedy genom tvořen složitým systémem pohlavních chromozomů s 11 X a 8 Y chromozomy a pouze jedním párem autozomů. Některé rasy mají dva různé dlouhé řetězce. Rasy s komplexní heterozygotností a bez ní vykazují stejné sociální chování. Komplexní heterozygotnost tedy není podmínkou kvazisociality, její vznik však přináší sociálně žijícím druhům selekční výhody. Komplexní heterozygotnost je jev v živočišné říši dosti neobvyklý. Kromě termitů a *D. cancerides* je známa i u několika nesociálních živočichů, např. u mnohonožek, ptakořitných savců a některých brouků (WHITE 1973).

Údaje o karyotypech ostatních sociálních pavouků jsou kusé a pocházejí většinou ze studií, které se zabývají poměry pohlaví. U žádného dalšího sociálního pavouka nebyla

zatím zjištěna komplexní heterozygotnost či jiná modifikace karyotypu, která by mohla usnadňovat evoluci sociality.

U snovaček rodu *Anelosimus* byly popsány karyotypy dvou kvazisociálních (*A. eximius* a *A. domingo*) a dvou subsociálních druhů (*A. jucundus*, *A. studiosus*). U samců všech druhů byl zjištěn shodný karyotyp  $2n\sigma = 22, X_1X_20$  (AVILÉS a MADDISON 1991). Z vyobrazení lze usuzovat, že všechny chromozomy jsou akrocentrické podobně jako u ostatních dosud studovaných snovaček (CHEN 1999). Samčí karyotyp subsociálního běžníka *Diaea socialis* je tvořen 22 autozomy a pohlavními chromozomy  $X_1$  a  $X_2$ . V karyotypu se vyskytuje také proměnlivý počet mikrochromozomů, popř. fragmentů (1-3) (ROWELL a MAIN 1992).

U stepníků rodu *Stegodyphus* byl publikován karyotyp subsociálního druhu *S. pacificus* ( $2n\sigma = 30, X_1X_20$ ; SHARMA A SINGH 1957) a kvazisociálních druhů *S. dunicola* ( $2n\sigma = 26, X_1X_20$ , AVILÉS *et al.* 1999) a *S. sarasinorum* ( $2n\sigma = 24, X_1X_20$ ; MITTAL 1970 a  $2n\sigma = 30, X_1X_20$ ; BOLE-GOWDA 1958, SHARMA a PARIDA 1987). Karyotypy třech druhů rodu *Stegodyphus* (*S. africanus*,  $2n\sigma = 29$  a  $30, X_1X_20$ , *S. mimosarum*,  $2n\sigma = 24, X_1X_20$  a *S. sarasinorum*  $2n\sigma = 30, X_1X_20$ ) jsem předložil ve své bakalářské práci. Rozptyl  $2n$  v karyotypu *S. africanus* je dán výskytem páru centrických fragmentů, který se u některých jedinců vytrácí pravděpodobně v důsledku nepravděpodobné segregace bivalentu v prvním meiotickém dělení (FORMAN *et al.* 2007). Tyto centrické fragmenty jsou patrně pozůstatkem po translokaci podstatné části páru na jiný pár.

## 2.5 Polyploidie u živočichů

Nejrozsáhlejšími známými mutacemi jsou polyploidie. Dochází při nich ke zmnožení genomové sady. Polyploidizace může být i dána zmnožením sad příslušného genomu (autopolyploidizací), častěji je však důsledkem mezidruhové hybridizace (allopolyploidie) (STEBINS 1947, SOLTIS a SOLTIS 1993). Krátce po polyploidizaci následuje redukce genomu, zbavování se přebytečných duplikovaných sekvencí. Čím větší doba uplynula od polyploidizace, tím hůře ji lze identifikovat. Dávni polyploidi (tzv. paleopolyploidi) mají totiž genom často již zpětně diploidizovaný (WOLFE 2001), bez odchylek v meiotickém dělení. Identifikace paleopolyploidních událostí se tak většinou neobejde bez molekulárně biologických technik.

Polyploidie hraje nezastupitelnou úlohu v evoluci genomu rostlin (STEBBINS 1940). Předpokládá se, že až 80 % druhů krytosemenných rostlin je polyploidního původu

(MASTERSON 1994). U živočichů jsou polyploidní události méně časté (MÜLLER 1925, ORR 1990, OTTO a WHITTON 2000, MABLE 2004), přesto existuje několik živočišných skupin, v jejichž evoluci sehrála polyploidie důležitou roli. Dvě třetiny živočišných polyploidů se vyskytují u partenogenetických živočichů (OTTO a WHITTON 2000). Polyploidie spojená s partenogenezí byla zaznamenána nejen u mnoha skupin bezobratlých (např. hmyz, ploštěnky, korýši) (GREGORY a MABLE 2005), ale i u některých obojživelníků, ryb a plazů (BOGART 1980).

První práce vysvětlující rozdíl mezi incidencí polyploidie u rostlin a živočichů považovala za překážku vzniku polyploidních živočichů negativní ovlivnění faktorů určujících pohlaví (MÜLLER 1925). Müller vyvozuje, že pokud je pohlaví určeno dávkou pohlavních faktorů nesených pohlavími chromozomy nebo poměrem dávek pohlavních faktorů nesených pohlavními chromozomy a autozomy (jako např. u *Drosophila*), budou mít nově vzniklí polyploidi tento poměr narušen, což povede ke sterilitě potomstva. Jak upozorňuje např. MABLE (2004), mnoho dalších autorů považovalo od té doby samotnou existenci pohlavních chromozomů za zábranu vzniku polyploidie, a to i u skupin, u kterých není nic známo o molekulární podstatě mechanismů určujících pohlaví. Jak však bylo prokázáno na několika hybridních komplexech u žab, samotná existence pohlavních chromozomů, zejména relativně nediferencovaných, není překážkou polyploidizačních událostí (OHTA *et al.* 1999).

Ukončený růst většiny živočichů, který nelze skloubit s větší velikostí polyploidních buněk často nelézanou u rostlin (STEBBINS 1950), byl některými chápán jako další zábrana polyploidizace u živočichů. Jak upozornili někteří badatelé, partenogenetičtí polyploidi nemají s ukončeným růstem problémy (např. ORR 1990). Navíc velikost živočišných buněk po polyploidizaci nestoupá tak strmě jako u rostlin (KONDOROSI *et al.* 2000). MABLE (2004) upozorňuje na další faktor, často mylně spojovaný se znesnadňováním fixace polyploidie u živočichů, kterým je vyšší migrační schopnost živočichů, která znesnadňuje dostatečnou reprodukční izolaci nově vzniklých polyploidů a rozmělní nově vzniklou polyploidii zpětnými kříženími s původními formami. Podle této logiky by ale větší migrační schopnost znemožňovala řadu živočišných sociací (MABLE 2004). Mechanismy způsobující vznik polyploidů (oplození neredukovanými gametami, dispermické oplození) jsou i mezi vyššími živočichy relativně časté. V průměru 0,9 % kuřecích embrií je tri nebo tetraploidní (BLOOM 1972), u 5,3 % lidských spontánních potratů byla zjištěna zvýšená ploidie (CREASY *et al.* 1976). V kontrastu k relativně



vysokému “polyploidizačnímu potenciálu“ obou skupin nebyl objeven žádný polyploidní pták a pouze jedna polyploidní linie u savců (OTTO 2007). Velmi zhoršená životnost polyploidních zárodků bývá v současnosti dávána do souvislosti s imprintingem (OTTO a WHITTON 2000).

Nové přístupy ke studiu vzniku a fixace polyploidie uvažují také ekologické faktory. Polyploidie by mohla být častější u druhů z teplotně nevyvážených oblastí (MABLE 2000). Teplotní šoky mohou indukovat vznik neredukovaných gamet u ryb (VALENTI 1975). Genové duplikace vyplývající z polyploidie mohou být pozitivem při selekci, pro přežití v prostředí, které je pro diploidní formy extrémní (BROCHMAN 2004).

V roce 1970 navrhl OHMO teorii opakovaných duplikací, která postuluje účast duplikací různých částí genomu v evoluci, mj. i u organismů, které daly za vznik dnešním obratlovcům. Jeho tzv. 2R hypotéza předpokládá dvě polyploidizační události u původních obratlovců, z nichž jedna proběhla v kambriu a druhá v pozdním devonu (MAKALOWSKI 2001). Jedním z nejznámějších důsledků těchto duplikací genomu je zmnožení HOX genů, které umožnilo rozsáhlou morfologickou diferenciaci dnešních obratlovců. Důležitou roli hrály opakované polyploidie také v evoluci ryb, kde došlo k polyploidizaci v devíti řádech (COMBER a SMITH 2004) a také u některých obojživelníků (BECÁK *et al.* 1970). Velkou pozornost vzbudil popis tetraploidního savce, osmáka pouštního *Typanoctomys barrerae* (Octodontidae) (GALLARDO *et al.* 1999) a záhy dalšího druhu osmáka slaništního *Pipanacoctomys aureus* (MARES *et al.* 2000). *T. barrerae* je dnes savcem s nejvyšším počtem chromozomů ( $2n=102$ ). Pokusy s celochromozomovými sondami zpochybňovaly polyploidizaci jako příčinu zmnožení chromozomů osmáků, zvětšení genomu dávaly do souvislosti s expanzí repetitivních sekvencí (SVARTMAN *et al.* 2005). Další průzkumy prokázaly zdvojnásobení počtu rDNA klastrů a HOX genů polyploidních osmáků (GALLARDO *et al.* 2006), což podporuje polyploidizační hypotézu. Pokud uvážíme, že polyploidizace zasáhla v obou druzích i pohlavní chromozomy a že v karyotypech lze identifikovat některé čtveřice podobných chromozomů (GALLARDO *et al.* 1999, 2004), není pochyb o tom, že zde proběhla polyploidizace genomu.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Materiál:

Pro přípravu preparátů byla použita varlata subadultních nebo čerstvě svlečených adultních samců. U drtivé většiny druhů se nepodařilo odchytit vhodná stadia, ta musela být získána odchovem juvenilů v laboratorních podmínkách. U některých vzácných druhů (*Dorceus* cf. *fastuosus*, *S. sarasinorum* ze státu Kerala, Indie) byly k dispozici pouze samice. Preparáty byly v takových případech zhotovovány z vaječníků a střev. K měření obsahů DNA byly používány přednostně dospělé samice. U dvou druhů (*Eresus kollari* a *Adonea fimbriata*) byl měřen také obsah DNA u samců. Pohlaví nedospělých exemplářů použitých k měření obsahů DNA bylo stanoveno pitvou po skončení měření. Materiál byl získán vlastním sběrem nebo darem od mnoha českých i zahraničních kolegů. Determinaci prováděl Dr. M. Řezáč (VÚRV, Praha), který je expertem na systematiku čeledi Eresidae.

Některé druhy nejsou dosud vědecky popsány, v diplomové práci jsou označeny názvy, které jsou navrhovány v připravované revizi rodu *Eresus*. Jedná se o druhy *E. bulgaricus* a *E. balcanicus* (ŘEZÁČ připravováno). Jedinci označení jako *Eresus* sp. nov. náleží k nepopsanému druhu, pro něhož nebyl dosud navržen ani název. Druh *Eresus annulipes* byl dosud mylně řazen do rodu *Stegodyphus* (ŘEZÁČ připravováno). Jedinci *S. mimosarum* studovaní v diplomové práci pocházeli z JAR a jsou proto v textu odlišováni od populace z Tanzanie studované v bakalářské práci autora. Jako outgroup byli použiti zástupci dvou dalších čeledí náležících do nadčeledi Eresoidea, Oecobiidae (*Uroctea durandi*) a Hersiliidae (*Hersiliola punctuata*). Vypitvané exempláře nebo části jejich těl jsou deponovány v čistém lihu u Dr. Řezáče nebo u autora této práce, popř. byly poskytnuty pro molekulárně fylogenetické studie (MILLER *et al.*, připravováno). Seznam studovaných druhů s lokalitami a použitými cytogenetickými metodami je uveden v tabulce (tab. 3).

Druh	Lokality sběru	Země původu	Použité metody
<i>Adonea fimbriata</i>	Sed Boquer	Izrael	K, FCM, FISH
<i>Dorceus cf. fastuosus</i>	Maschabin	Izrael	K, FCM
<i>Dresserus kannemeyeri</i>	Ndumo Game Reserve	JAR	K, FCM
<i>Eresus sp. nov.</i>	Sed Boquer	Izrael	K, FCM
<i>Eresus kollari</i>	Podbaba, Praha	ČR	K, FCM, FISH
<i>Eresus sandaliatus</i>	Kabečnice	ČR	K
<i>Eresus annulipes</i>	Sede Boquer, Arad	Izrael	K, FCM
<i>Eresus balcanicus</i>	Albena	Bulharsko	K
<i>Eresus bulgaricus</i>	Albena	Bulharsko	K, FCM
<i>Eresus walckenaeri</i>	Agios Georgios, Milina, Akrokorint, Dimitsána	Řecko	K, FCM
<i>Gandanameno sp.</i>	De Hoop; Kapské Město	JAR	K, FCM
<i>Stegodyphus africanus</i>	Ndumo Game Reserve	JAR	C
<i>Stegodyphus dufouri</i>	El Fayum (Siwa)	Egypt	K
<i>Stegodyphus dumicola</i>	Ndumo Game Reserve	JAR	K, FCM
<i>Stegodyphus lineatus</i>	Sed Boquer	Izrael	K, FCM
<i>Stegodyphus mimosarum</i> (JAR) <sup>1</sup>	KwaZulu Natal	JAR	K, FCM, FISH
<i>Stegodyphus sarasinorum</i>	Vattakotai (Tamil Nadu), Kozhikode district (Kerala)	Indie	K, FCM
<i>Uroctea durandi</i> <sup>2</sup>	Chani Therovou; Krka	Řecko; Chorvatsko	K
<i>Uroctea durandi</i> <sup>2</sup>	Palao u Mogadur, Thorea	Portugalsko	FCM
<i>Hersiliola punctuata</i> <sup>2</sup>	Sede Boquer	Izrael	K

Tab. 3: Seznam zkoumaných druhů s lokalitami a použitými metodami: K = chromozomové preparáty, FCM = měření obsahu DNA průtokovou cytometrií, FISH = vizualizace rDNA klastřů v nukleolárních organizátorech metodou FISH, C = vizualizace konstitutivního heterochromatinu pomocí C pruhování. <sup>1</sup>v rámci diplomové práce byla studována populace z JAR, jež není totožná s tanzanskou populací, kterou se autor zabýval v bakalářské práci. <sup>2</sup> zástupci dalších čeledí nadčeledi Eresoidea.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Zhotovení chromozomových preparátů

Pavouci byli pitváni ve fyziologickém roztoku pro motýly rodu *Ephestia* (LOKWOOD 1961). Ihned po jejich usmrcení jim byla pod stereolupou vypitvána varlata. Varlata byla následně hypotonizována 12-15 minut v 0,075 M roztoku KCl a dvakrát fixována směsí methanolu (p.a., Sigma Aldrich) a kyseliny octové (p.a., Merck) (3:1). Doba první fixáže byla 10 minut, druhé 20 minut. Na vyčištěné podložní sklíčko byl přenesen kousek nafixovaného varlete a ihned zakápnut 2-3 kapkami 60 % kyseliny octové. Pomocí páru wolframových jehel byla pod stereolupou v kapce vyrobena suspenze buněk. Preparát byl poté přenesen na histologickou ploténku o teplotě 40 °C. Kapka suspenze byla vláčena wolframovou jehlou po povrchu sklíčka, dokud nedošlo téměř k jejímu úplnému odpaření, zbytek kapky s nečistotami byl sklepnut z preparátu. Kvalita preparátů (stupeň rozptřetí chromozomových figur, hustota buněk) byla kontrolována pomocí fázového kontrastu. Vyrobené preparáty byly obarveny další den (25 minut) 5 % roztokem barviva Giemsa (Merck) v Sörensenově fosfátovém pufru (pH 6,8) nebo uskladněny neobarvené pro další aplikace (viz. dále). Podmínky uskladnění preparátů se lišily podle typu metody, na kterou byly následně použity. Preparáty byly skladovány při 7 – 10 °C (pro C pruhození), anebo byly odvodněny ve vzestupné ethanolové (70 %, 80 % a 96 % čistý ethanol, po 1 minutě) a skladovány při -20 °C v mrazničce (pro FISH).

Obarvené preparáty byly prohlíženy mikroskopem (Jenaval nebo Olympus BX 50). Vybrané figury byly prohlíženy pomocí imerzního objektivu a fotografovány na mikroskopu Jenaval na černobílý film Kodak Technical Pan. Filmy byly vyvolávány standardním postupem, tedy vývojkou Kodak Professional HC-110 a universálním rychloustalovačem Fomafix (Foma). Fotografie byly digitalizovány pomocí skeneru kinofilmů Nikon Cool Scan. K přípravě karyogramů byly použity mitotické metafáze nebo metafáze II. Karyogramy jednotlivých druhů byly vytvořeny pomocí programu Corel Photo Paint X3. Relativní délka jednotlivých chromozomů byla měřena pomocí programu Image Tool, morfologie chromozomů byla charakterizována pomocí Levanovy klasifikace chromozomů (LEVAN *et al.* 1964).

### 3.2.2 Vizualizace konstitutivního heterochromatinu pomocí C pruhování

Vybrané preparáty byly použity pro vizualizaci konstitutivního heterochromatinu pomocí C-pruhování. Preparáty na C pruhování byly připraveny způsobem popsáným výše. Teplota histologické ploténky byla však snížena na 30 – 35 °C, aby se zabránilo přílišné destrukci chromatinu. Pro C pruhování se osvědčilo používat preparáty několik dnů staré (optimum bylo pět dnů). Preparáty byly nejprve inkubovány hodinu při teplotě 60 °C. Po jejich ochladnutí byly předpůsobeny 0,2 N HCl po dobu 45 min. (pokojová teplota), čímž došlo k rozvolnění chromatinu. Po oplachu destilovanou H<sub>2</sub>O byly preparáty sušeny 2-3 hod. při pokojové teplotě. Následovně byly preparáty denaturovány v nasyceném roztoku Ba(OH)<sub>2</sub> (3-5 min., 50 °C) a ihned oplachovány destilovanou H<sub>2</sub>O o teplotě 35 °C, čímž se zamezilo vzniku sraženiny BaCO<sub>3</sub> na skle. Po dalších 2-3 hodinách schnutí byly preparáty renaturovány po dobu 75 min. v 2x SSC pufru (60 °C) a pak omyty destilovanou H<sub>2</sub>O. Další den byly preparáty barveny 5 % roztokem barviva Giemsa v Sörensenově fosfátovém pufru, a to 75 min. K pozorování a vyhodnocení preparátů byly použity stejné přístroje a software jako v předešlém případě.

### 3.3 Vizualizace NORů pomocí fluorescenční in situ hybridizace nepřímo značenou sondou

K vizualizaci genů pro NORů byla užita metoda fluorescenční in situ hybridizace (dále jen FISH). Účelem metody bylo zjistit počet a distribuci NORů v genomu vybraných druhů. Výroba a pozorování preparátů se uskutečnilo na Oddělení genetiky v Entomologickém ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích, v lab. Prof. F. Marece v Entomologickém ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Při FISH je fluorescenčně značená sonda hybridizována s chromozomovým preparátem, čímž je umožněna vizualizace sekvencí, homologických se sekvencí sondy. Při FISH nepřímo značenou sondou není sonda značena fluorochromem přímo, ale je detekována pomocí protilátky s navázaným fluorochromem. V našem případě byla sonda značena biotinem a k jeho detekci byl použit streptavidin.

Celogenomová DNA byla izolována ze samice *E. kollari* chloroform/fenol/izoamylalkoholovou extrakcí (GRAHAM 1978). Aby bylo redukováno pozadí, byla později pro přípravu sondy stejným postupem izolována i DNA ze samice nepříbuzného pavouka *Pholcus phalangioides* (Pholcidae). Z celogenomové DNA byl pomocí PCR amplifikován úsek rDNA. K amplifikaci byly použity primery 18S-Ins-forward primer (5'-CGATACCGCGAATGGCTCAATA-3') a 18S-Ins-reverse primer (5'-

CAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC-3') (Generi Biotech) designované pro hmyz. Na jednu PCR reakci (celkový objem 25  $\mu$ l) byly použity následující komponenty: 10 $\times$  Ex *Taq* pufr (10  $\mu$ l) a 5 U/ $\mu$ l *TaKaRa Ex Taq* HS DNA polymeráza (0,40  $\mu$ l) (Takara), dNTP o koncentraci 2,5 mM (2  $\mu$ l), 100 ng templátové DNA, 1,25  $\mu$ l každého z primerů (koncentrace 10  $\mu$ M), do finálního objemu bylo doplněno miliQ H<sub>2</sub>O. Po počáteční denaturaci (3 min., 94 °C) následovala série 30 cyklů PCR (denaturace 94 °C po dobu 1 min., nasedání primerů 51 °C po dobu 1 min., a fáze prodlužování řetězce 72 °C po dobu 1,5 min.). Fáze prodlužování řetězce byla v posledním cyklu prodloužena na 10 min. Po PCR byla směs podrobena elektroforetické separaci v 1 % agarosovém gelu. Výsledný proužek, odpovídající produktu PCR, byl z gelu vyříznut a DNA byla extrahována kitem QIAquick Gel Extraction (Qiagen GmbH). Extrahovaná 18S rDNA byla zamražena po pozdější hybridizaci nebo ihned značena a hybridizována. Část objemu této sondy byla použita jako templát pro další PCR amplifikaci, jejíž produkt byl následně naznačen biotin-14-dATP metodou "nick" translace pomocí kitu Bionick Labeling System (od firmy Invitrogen, LifeTechnologies Inc.).

Ke značené sondě (byla v množství odpovídajícímu 45 ng sondy na jeden preparát) byla přidána DNA z lososích spermií ( $c = 10 \mu\text{g/l}$ , 2,5  $\mu\text{l/preparát}$ ), která vyvazuje drobné fragmenty nespecifických sekvencí. Sonda byla precipitována přidáním Na-acetátu a podchlazeného ethanolu (100 %), po centrifugaci (20 min., 13 tis. otáček/min.) byl k peletu přidán ethanol. Po opětovné centrifugaci (15 min., 13 tis. otáček/min.) a odsátí supernatantu byla sonda zcela vysušena při 37 °C a rozpuštěna ve 100 % formamidu (Fluka) při teplotě 37 °C po dobu 30 min. Po přidání 20 % dextransulfátu (5  $\mu\text{l}$  na preparát) byla sonda denaturována při 95 °C po dobu 5 minut a ihned přemístěna na led. Poté byla sonda aplikována na připravené preparáty (viz dále).

Kvalitní neobarvené preparáty byly vyjmuty z mrazničky. Po jejich odvodnění ve vzestupné ethanolové řadě byly inkubovány 4 hod. při 65 °C a pak v roztoku proteinázy K (5 min., 37 °C). Následovalo promývání v kyvetách s 1x PBS, 2x 5 min. (37 °C). Tento krok odstraňuje přebytečnou cytoplazmu a byl později vypuštěn, neboť neměl vliv na kvalitu preparátů. K odstranění RNA, jež by mohla interagovat se sondou, bylo na každý preparát předpůsobeno 100  $\mu\text{l}$  roztoku RNázy A (Biotech). Preparát byl zakryt krycím sklem, inkubován 1 hod. při 37 °C, pak dvakrát 5 min. promýván v kyvetách s 1x PBS (37 °C) a nakonec inkubován v kyvetě s 5x Denhardtovým reagens za třepání (37 °C, 30 min.). V dalším kroku byl každý preparát byl zalit 100  $\mu\text{l}$  70 % formamidu, zakryt krycím

sklem a denaturován v termomixu (3 min., 68 °C). Ihned po denaturaci byly preparáty ponořeny do podchlazeného 70 % etanolu a odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou. Na každé sklíčko bylo aplikováno 10 µl denaturované hybridizační směsi. Po zakrytí krycím sklem a zarámování jeho okrajů Rubber cementem byla skla inkubována přes noc v temné vlhké komůrce (37 °C).

Další den bylo z preparátů odstraněno krycí sklíčko s Rubber cementem, následovala série promývání v kyvetách umístěných v třepacích vodních lázních. Tato promývání odstraňují nehybridizovanou sondu, která by vytvářela pozadí interferující se signály. Nejprve byly preparáty promývány ve třech kyvetách s 50 % formamidem v 2x SSC (v každé 5 min. při 46 °C), následně v pěti kyvetách s 2x SSC (v každé 2 min. při 46 °C) a nakonec ve třech kyvetách s 0,1x SSC (v každé 5 min. při 62 °C). Opakovaným promýváním v několika kyvetách byl zajištěn důkladný oplach skel. Po oplachu byly preparáty ponořeny na 5 min. do kyvety s 4x SSC/0,1 % Tween 20, a to bez třepání ve tmě při pokojové teplotě. Následovala detekce sondy. Nejprve byla zablokována reakce, a to pomocí 2,5 % BSA (Fluka) (500 µl na každé sklo). Preparáty byly pro blokování přikryty krycím sklíčkem a inkubovány ve tmě (20 min. při pokojové teplotě). Posléze bylo na preparát nakápnuto 100 µl Cy3 streptavidinu (Biotech), po zakrytí krycím sklíčkem byl preparát opět inkubován (30 minut ve tmě). Preparáty byly proprány 3x 3 min. v 4x SSC/0,1 % Tween 20 (37 °C). Po opětovném blokování reakce 2,5 % BSA bylo na preparáty aplikováno 50 µl antistreptavidinu (Biotech) (inkubace pod krycím sklem, 37 °C, 20 min.), preparáty byly proprány stejným způsobem jako v předchozím případě. Následovala další blokace reakce a zesílení signálu 100 µl Cy3 streptavidinu (inkubováno pod krycím sklem, 37 °C, 20 min.). Po posledním proprání ve třech kyvetách s 4x SSC/0,1 % Tween 20 (3x 3 min., 37 °C) a oschnutí preparátů byly chromozomy obarveny pomocí fluorescenčních barviv DAPI (Sigma-Aldrich) nebo YOYO (Invitrogen). Po zakápnutí 20 µl antifade byl preparát zakryt krycím sklíčkem, které bylo zarámováno lakem na nehty a připraveno tak pro pozorování.

Preparáty byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2, který byl vybaven příslušnými sadami fluorescenčních filtrů. Černobílé digitální fotografie byly snímány chlazenou CCD kamerou F-View (Olympus), a to pro každou fluorescenční barvu zvlášť. Jednotlivým fluorochromům byly počítačově přiřazeny vybrané barvy (modrá - DAPI, zelená - YOYO, červená - Cy3). Výsledný obraz byl zkompletován v programu Corel Photo PaintX3.

### 3.4 Měření obsahu DNA

U vybraných druhů byl pomocí průtokové cytometrie (FCM) měřen obsah DNA a procentuální zastoupení GC/AT bazí v genomu. Měření probíhala v Ústavu botaniky a zoologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně (laboratoř Doc. P. Bureše).

FCM je relativně rychlá metoda umožňující stanovit obsah DNA v jednotlivých jádrech. Jádra s DNA obarvenou fluorochromem procházejí měřicím přístrojem (cytometrem), kde jsou ozářena laserem. Excitovaný flouorchrom poté vyzáří světlo, jehož intenzita je přímo úměrná množství navázaného flouorchromu (tj. množství DNA). Vyzářené světlo je detekováno a analyzováno výpočetní částí cytometru. Měření je zároveň vzorek a standard o známém obsahu DNA, který slouží k výpočtu obsahu DNA ve vzorku. Standard by měl být zvolen tak, aby svou velikostí odpovídal řádově 20 - 300 % obsahu DNA u zkoumaného organismu (DOLEŽEL *et al.* 2007). Pokud nelze získat vhodný standard, lze použít sekundární standard, jehož obsah DNA je znám jen přibližně a který je následně proměřen vůči primárnímu standardu s přesně známým obsahem DNA.

Měření byla prováděna tzv. dvoustupňovou metodou (OTTO 1990, DOLEŽEL a GODHE 1995) s drobnými modifikacemi (nebyla užívána RNáza). Použití dvou vhodných flouorchromů s různou specifitou vazby na DNA umožňuje stanovit procentuální obsah GC/AT bazí. Zatímco DAPI se váže preferenčně na AT, interkalační barviva jako např. PI se vážou na DNA neselektivně (DAGHER-KHARRAT *et al.* 2001). V tomto případě bylo použito DAPI a PI.

Primárním standardem byly lidské leukocyty. Pro některá měření byly použity následující sekundární standardy: mladé listy rostliny talovínu zimního *Eranthis hyemalis* (1C = 9,30 pg, BENNETT a SMITH 1976) popřípadě bobu zahradního *Vicia faba* (1C = 13,33 pg, BENNETT a SMITH 1976) popř. stepník *E. walckenaeri*. Cca 1cm<sup>2</sup> mladého lístku rostliny byl na Petriho misce zalit 15 ml chlazeného pufru Otto I (DOLEŽEL a GODHE 1995) a homogenizován žiletkou, směs byla přefiltrována přes nylonové sítko o průměru otvorů 42 µm. Suspenze buněk byla uchovávána na ledu. Lidské leukocyty byly izolovány z mužské krve v Biofyzikálním ústavu AVČR v Brně a uskladněny v roztoku ethanolu při 4 °C. Pokud byl jako standard použit *E. walckenaeri*, příprava standardu byla identická jako příprava vzorků (viz níže).



Příprava vzorků probíhala následovně. Po odstříhnutí části nohy bylo pavoukům odebráno z pahýlu několik kapek vytékající hemolymfy na Petriho misku. Vzorek byl ihned zalit 5-10 ml (podle množství hemolymfy) chlazeného pufru Otto I, který pomáhá udržovat integritu jader. U drobnějších exemplářů se odběr hemolymfy nedařil. V těchto případech byla k měření použita celá končetina, která byla po zalití pufrem Otto I rozsekána žiletkou a přefiltrována přes nylonové sítko. Vzorek byl rozdělen do dvou kyvet a byl přidán standard. Celá směs byla smíchána s 1 ml roztoku DAPI nebo PI v pufru Otto II (DOLEŽEL a GODHE 1995) a krátce promíchána na třepačce. Pokud došlo k vytvoření sraženiny, byla odfiltrována přes nylonové sítko. Obsah kyvet byl analyzován na cytometrech od firmy Partec, Partec CyFlow ML nebo Partec CyFlowSC (pro PI) a Partec PA1 (pro DAPI). Každý analyzovaný druh byl nejprve krátce proměřen bez standardu, aby se odhadla přibližná velikost genomu a mohl se zvolit vhodný standard. Pokud to umožnil dostatek materiálu, bylo od každého druhu změřeno 5 jedinců. Měření každého jedince bylo opakováno třikrát v různých dnech (pokud měřený jedinec nezemřel dříve), aby se eliminovala případná chyba přístrojů. V tabulce (tab. 4) jsou uvedeny standardy užívané pro měření jednotlivých druhů, počty jedinců a počty opakování měření, byli měřeni co nejpodobnější jedinci. V každém měření bylo analyzováno 5000 částic. Rychlost měření byla průběžně korigována na optimálních 10-15 částic za sekundu. Výsledné histogramy byly analyzovány pomocí programu Flomax PARTEC.

Druh	Používaný standard	Počet analyzo- vaných jedinců	Příbuzenský vztah měřených exemplářů
<i>Eresus</i> sp. nov. ♀	člověk	6	sestry
<i>Eresus bulgaricus</i> ♀	člověk	5	jedinci ze stejné lokality
<i>Dorseus</i> cf. <i>fastuosus</i> ♀	člověk	1	jeden exemplář
<i>Dresserus kannemeyeri</i> ♀	<i>Eresus walckenaeri</i>	5	sestry
<i>Stegodyphus dumicola</i> ♀	<i>Eranthis hyemalis</i>	5 (2*)	jedinci ze stejné lokality
<i>Stegodyphus mimosarum</i> ♀ (JAR)	<i>Eranthis hyemalis</i>	5 (1*)	jedinci ze stejné lokality
<i>Eresus annulipes</i> ♀	<i>Eranthis hyemalis</i>	4	různé lokality (jižní Izrael)
<i>Stegodyphus sarasinorum</i> ♀	<i>Eranthis hyemalis</i>	5	jedinci z jedné kolonie
<i>Uroctea durandi</i> ♀	člověk	5(3*)	různé lokality, Portugalsko
<i>Adonea fimbriata</i> ♀	<i>Vicia faba</i>	5	sestry
<i>Adonea fimbriata</i> ♂	<i>Vicia faba</i>	5(2*)	bratři
<i>Eresus kollari</i> ♀	<i>Vicia faba</i>	6	jedinci ze stejné lokality
<i>Eresus kollari</i> ♂	<i>Vicia faba</i>	5	jedinci ze stejné lokality
<i>Gandanameno</i> sp. ♀	<i>Vicia faba</i>	2**	dvě vzdálené lokality
<i>Stegodyphus lineatus</i> ♀	<i>Vicia faba</i>	5	jedinci ze stejné lokality
<i>Eresus walckenaeri</i> ♀	člověk	5	různé lokality, Peloponés

Tab. 4: Měření obsahů DNA, seznam studovaných druhů a příslušných standardů. Měření každého jedince bylo v ideálním případě opakováno třikrát v různých dnech \*číslo v závorce udává počet jedinců, kteří uhynuli před třetím měřením a byli změřeni jen dvakrát \*\*u rodu *Gandanameno* byly k dispozici dva exempláře, které se zatím nepodařilo určit do druhu. Tito jedinci pochází z navzájem vzdálených lokalit a nelze vyloučit, že se jedná o dva různé druhy.

Primárním standardem byly mužské leukocyty. Poměry sekundárních standardů k standardu primárnímu byly stanoveny opakovanými (6 – 10x) měřeními sekundárních standardů proti primárnímu standardu (tj. člověku). Pokud byly vzorky měřeny proti

sekundárnímu standardu, byly naměřené údaje přepočteny na poměr ku primárnímu standardu. Z vypočteného nebo změřeného poměru analyzovaných vzorků ku primárnímu standardu byly stanoveny výsledné hodnoty C pavoučích vzorků. K přepočtům byla použita hodnota C mužských leukocytů 3,5 pg (dle OLMO 1983).

Výsledná hodnota C pro druh byla stanovena zprůměrováním všech naměřených hodnot (v ideálním případě tedy průměrem z 15 měření). Byla stanovena směrodatná odchylka výsledné hodnoty C druhu od hodnot C stanovených pro každého jedince tohoto druhu. U druhů, kde byl k dispozici pouze jeden nebo dva jedinci, nebyla směrodatná odchylka počítána. Sledovány byly také koeficienty variability (CV) generované vyhodnocovacím programem. CV je ukazatel informující o kvalitě histogramu a indikuje spolehlivost provedeného měření. Jeho zvyšování způsobují jak nepřesnosti v přípravě vzorku tak přítomnost metabolitů v měřených tkáních, které interagují s použitými barvivem (DOLEŽEL *et al.* 2007). Byl stanoven průměrný koeficient variability (CV) pro sérii měření každého druhu pro obě barviva a to jak CV standardu tak CV vzorku.

K výpočtu procentuálního zastoupení bazí v genomu byla použita předprogramovaná tabulka přístupná online (<http://www.sci.muni.cz/botany/systemgr/smarda/>) pracující podle následujícího algoritmu odvozeného Barrowem a Meisterem (2002):

$$\frac{(1 - AT_{vz}) \times AT_{vz}^n}{1 - AT_{vz}^n} - DF\_DAPI \times \frac{(1 - AT_{st}) \times AT_{st}^n}{1 - AT_{st}^n} = 0$$

Stanovení poměru párů bazí (tj. procenta AT v genomu, označeno jako AT<sub>vz</sub>) probíhalo následovně: Naměřené hodnoty vzorků byly přepočítány na poměr k primárnímu standardu obou barviv (stejným způsobem jak je popsáno výše). Byl stanoven faktor barvitelnosti tzv. DF\_DAPI, který slouží jako základ pro výpočet procentuálního zastoupení párů bazí. DF\_DAPI je poměr mezi hodnotami vzorku (resp. poměry vzorku k primárnímu standardu) určenými pro DAPI (tj. barvivem specifickým pro jeden typ páru bazí) ku hodnotám (resp. násobkům primárního standardu) z měření s neselektivním barvivem (v tomto případě PI). Další hodnotou používanou při výpočtu poměru bazí je tzv. „vazebná délka barviva“ (n). Barvivo specifické pro určitý pár bazí potřebuje několik po sobě jdoucích shodných bazí aby se navázalo na DNA. V případě DAPI je n = 4 (PORTUGAL

a WARING 1988). Poměr párů bazí u primárního standardu (mužských leukocytů, označeno ATst) byl uvažován 0,5859 (to odpovídá 58,59 % AT, VINOGRADOV 1997). Výpočty byly prováděny v programu Microsoft Excel.

#### 4. Výsledky

##### 4.1 Karyotypy studovaných druhů

U všech studovaných druhů (17) byl stanoven diploidní počet chromozomů, u většiny (15 druhů) byl spolehlivě určen také systém pohlavních chromozomů. Velikost autozomů se u všech studovaných druhů snižovala pozvolně a tak nebylo možno utvořit žádné velikostní skupiny chromozomů.

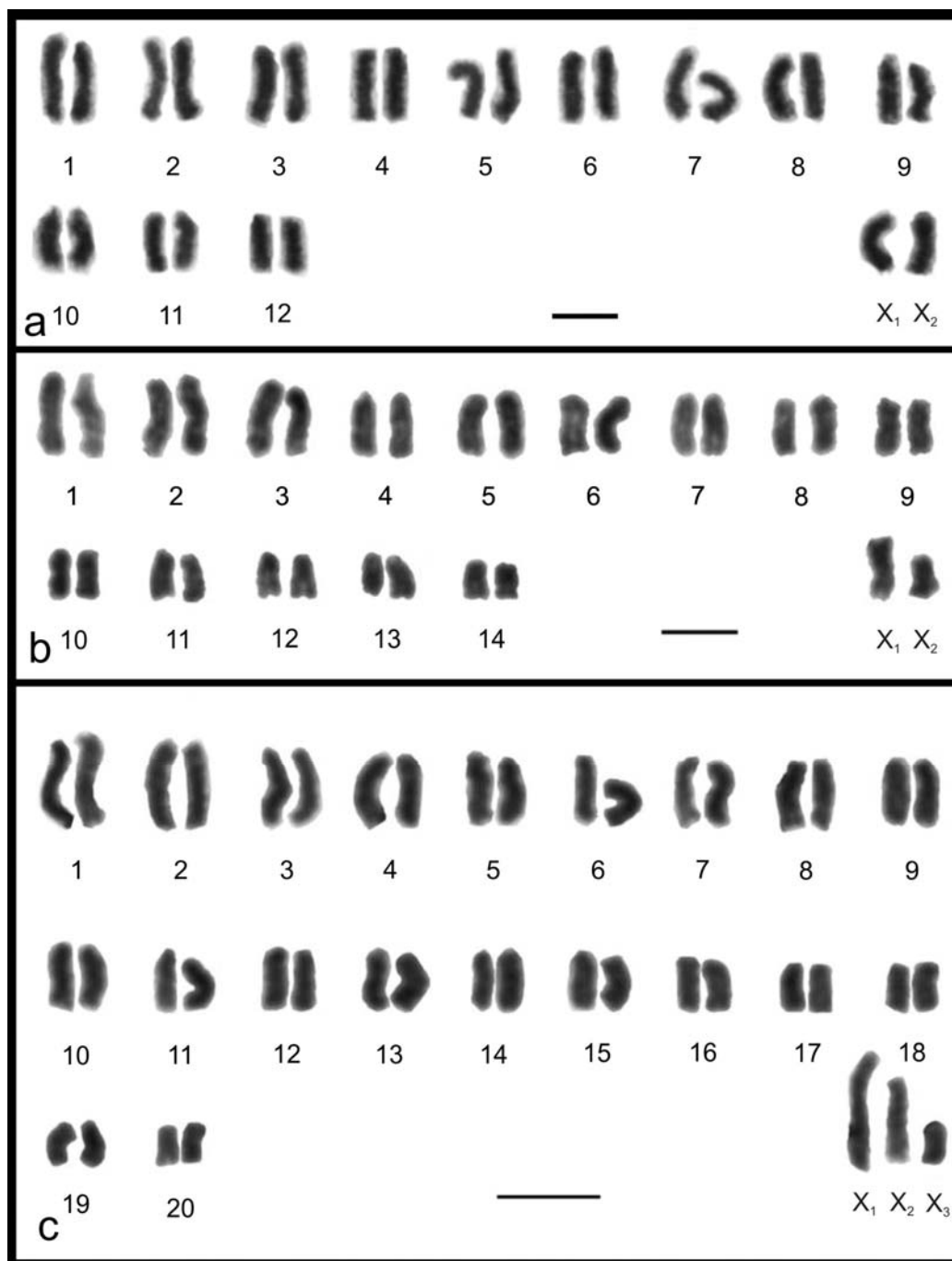
##### 4.1.1 Rod *Stegodyphus*

V rámci diplomové práce bylo studováno 6 druhů. Karyotypy všech zástupců rodu *Stegodyphus* jsou složeny výlučně z akrocentrických chromozomů.

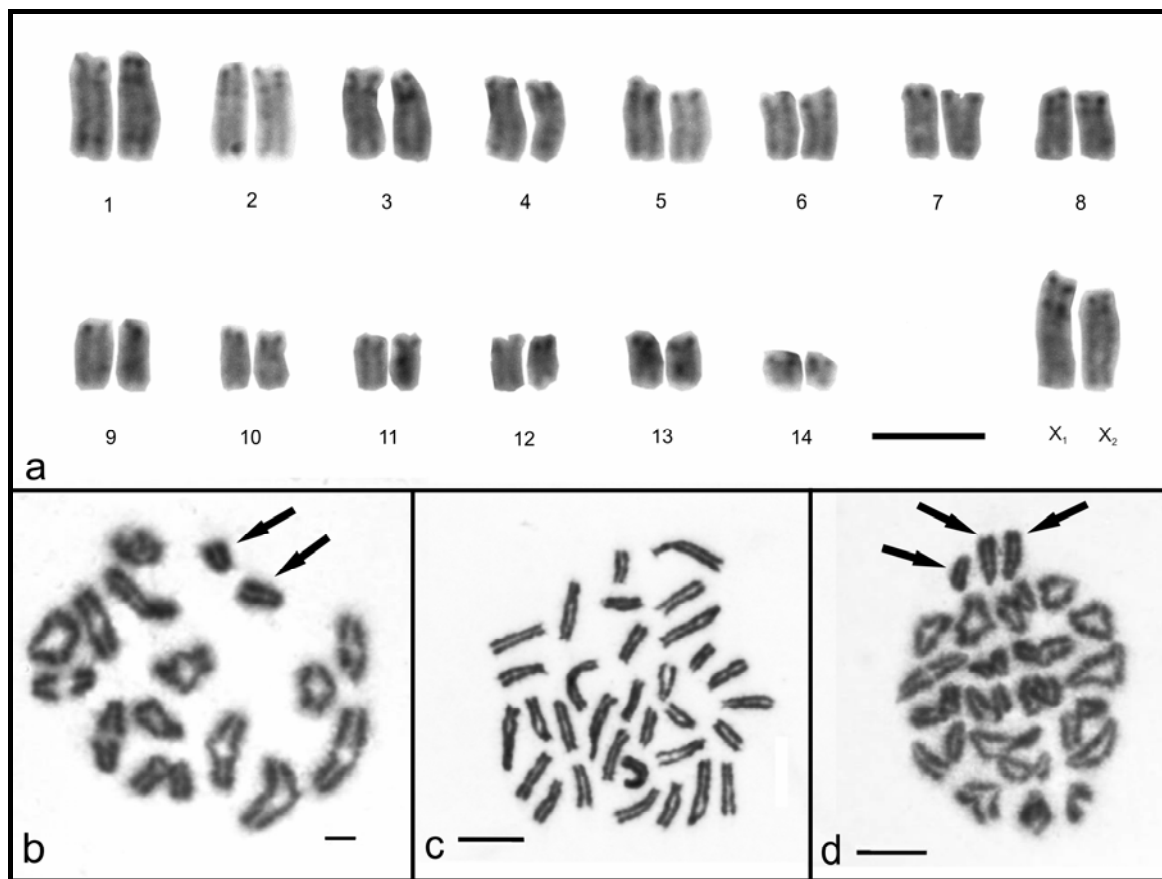
Samčí karyotyp sociálního druhu *S. dumicola* je tvořen 26 chromozomy, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  (obr. 1a). Poměr délek pohlavních chromozomů  $X_1$  a  $X_2$  v diakinezi byl 1,32:1 (počet měřených figur:  $n = 2$ ). Karyotyp samce subsociálního druhu *S. dufouri* se skládá z 30 chromozomů, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  (obr. 1b).  $X_2$  je zřejmě menší než u předešlého druhu, poměr délek pohlavních chromozomů nebylo možno přesně určit pro nedostatek vhodných figur (přibližně 2:1). Stejný karyotyp byl zjištěn u sociálního druhu *S. mimosarum* (JAR) (obr. 2b) a u obou studovaných populací dalšího sociálního druhu, *S. sarasinorum* z Indie (obr. 2c). U *S. mimosarum* byl délkový poměr chromozomů  $X_1$  a  $X_2$  v diakinezi 1,44:1 ( $n = 2$ ), u druhu *S. sarasinorum* byl stanoven již v bakalářské práci autora a nyní se od něj neodlišoval.

V rámci bakalářské práce byl studován i další druh rodu, *S. africanus* (samci měli 28 nebo 30 chromozomů a gonozomální systém  $X_1X_20$ ). Jedinci se lišili v přítomnosti páru mikrochromozomů, tento rozdíl byl pozorován u sourozenců. V diplomové práci jsem analyzoval u tohoto druhu obsah a distribuci konstitutivního heterochromatinu v karyotypu, a to pomocí C pruhování. Karyotyp tohoto druhu obsahuje malé množství konstitutivního heterochromatinu. Každý chromozomový pár nese drobný blok v centromerické oblasti. Centromerický pruh na mikrochromozomu je přibližně stejně velký jako C pruhy ostatních chromozomů. U 4 párů autozomů (páry č.: 1, 2, 3 a 8) a chromozomu  $X_1$  byl pozorován také subcentromerický C pruh (obr. 2a). V rámci rodu měl nejodlišnější karyotyp subsociální druh *S. lineatus*, jehož samčí karyotyp je tvořen 43

chromozomy (obr. 1c). Systém chromozomového určení pohlaví je  $X_1X_2X_30$  (obr. 2d). Délkový poměr gonozomů byl 1,67:1,5:1 (diakineze  $n = 3$  metafáze II  $n = 1$ ).



Obr. 1: Karyotypy samců rodu *Stegodyphus*. a - sociální druh *S. dunicola*,  $2n = 26$ ,  $X_1X_20$ ; konstruováno z mitotické metafáze, b - subsociální druh *S. dufouri*,  $2n = 30$ ,  $X_1X_20$ ; sestaveno z metafáze mitotického dělení, c - subsociální druh *S. lineatus* má 43 chromozomů, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_2X_30$ ; zhotoveno z mitotické metafáze. Měřítka = 10  $\mu$ m.



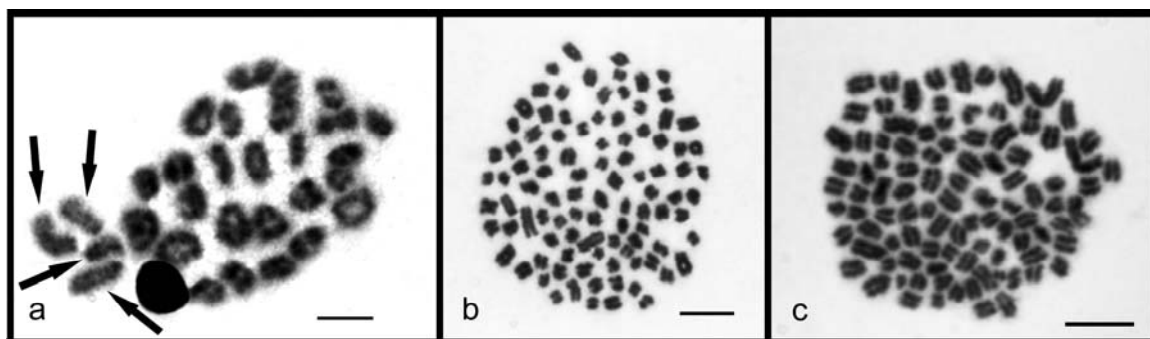
Obr. 2: Karyologie rodu *Stegodyphus*. a - samec *S. africanus*, jedinec s párem mikrochromozomů. Vizualizace konstitutivního heterochromatinu pomocí C pruhování, mitotická metafáze. Všechny chromozomy mají malý centromerický blok konstitutivního heterochromatinu. Autozomové páry č. 1, 2, 3, 8 a pohlavní chromozom  $X_1$  mají navíc subcentromerický blok konstitutivního heterochromatinu, b - samec *S. mimosarum* (JAR),  $2n = 30$ , pozdní diakineze; 14 autozomálních bivalentů a dva pohlavní chromozomy X (šipky), c - samice *S. sarasinorum*, mitotická metafáze (32 chromozomů), d - samec *S. lineatus*, diakineze. Šipky ukazují na tři pohlavní chromozomy X. Měřítko = 10  $\mu$ m.

#### 4.1.2 Rod *Eresus*

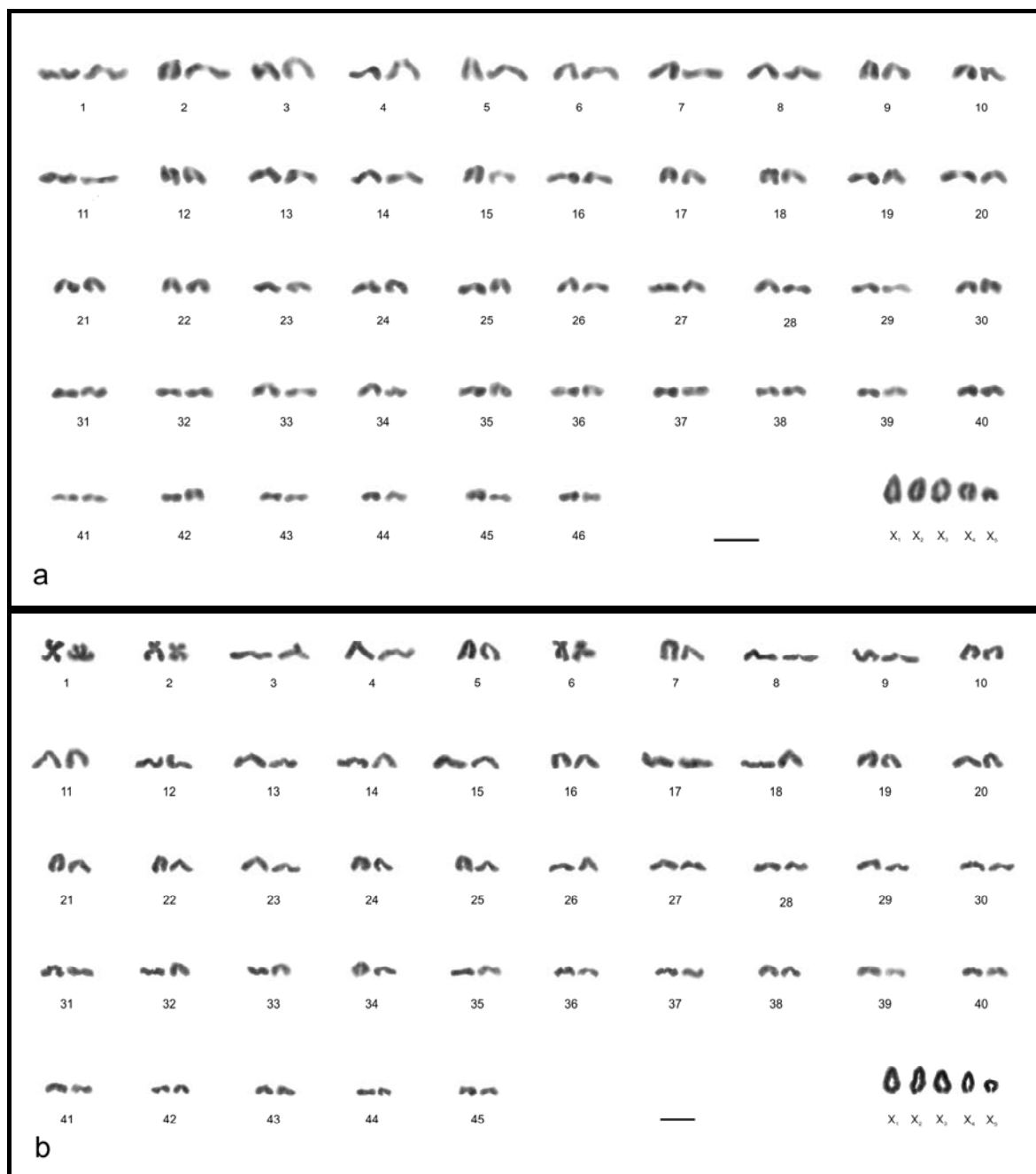
Největší diverzita karyotypů byla nalezena u rodu *Eresus*, byly studovány karyotypy sedmi druhů. Z hlediska počtu chromozomů je možno odlišit dvě skupiny. Karyotyp samce druhu *E. annulipes* byl tvořen 56 chromozomy, systém určení pohlaví je  $X_1X_2X_3X_40$  (obr. 3a). Všechny chromozomy jsou akrocentrické. Vzájemné délkové poměry gonozomů se nepodařilo určit s jistotou v důsledku nedostatku vhodně rozprostřených figur (v diakinezi přibližně 1,48:1,43:1,15:1,  $n = 1$ ).

Ostatní druhy rodu měly výrazně vyšší počty chromozomů. Samčí karyotyp druhu *E. sandaliatus* byl tvořen 97 chromozomy (obr. 3c), systém pohlavních chromozomů byl  $X_1X_2X_3X_4X_50$ . Délkové poměry gonozomů byly 2,3:2,1:1,9:1,3:1 (diakineze,  $n = 1$ ).

a metafáze II,  $n = 1$ ). Nebyl pozorován žádný dvouramenný chromozom, ale k dispozici byly pouze metafáze II nižší kvality. Pohlavní chromozomy jsou akrocentrické. Stejný diploidní počet chromozomů mají i samci dvou dalších mediteránních druhů, *E. balcanicus* (obr. 3b) a *E. bulgaricus* (obr. 4a). Všechny chromozomy *E. bulgaricus* jsou akrocentrické, u druhého druhu se nepodařilo pozorovat dostatečně informativní meiotické figury a nelze u něj určit ani systém pohlavních chromozomů. Samec *E. bulgaricus* má pět pohlavních chromozomů X se vzájemným délkovým poměrem 1,85:1,73:1,66:1,41:1 (diakineze  $n = 4$ , metafáze II  $n = 3$ ). U *E. bulgaricus* byly všechny autozomy akrocentrické. Karyotyp samců *E. kollari* a *E. walckenaeri* je tvořen 95 chromozomy, systém pohlavních chromozomů je tvořen opět pěti akrocentrickými chromozomy X se vzájemnými délkovými poměry 2,12:2:1,85:1,65:1 (diakineze,  $n = 2$ , metafáze II,  $n = 3$ ) u *E. kollari* a 2,02:1,74:1,68:1,55:1 (diakineze  $n = 2$ , metafáze II  $n = 3$ ) u *E. walckenaeri*. V karyotypu *E. kollari* převažovaly akrocentrické chromozomy, tři páry chromozomů (č. 1, 2 a 6) byly ale metacentrické (obr. 4b). *E. walckenaeri* se od předešlého druhu lišil morfologií některých autozomových párů (obr. 5a). *E. walckenaeri* má celkem devět párů dvouramenných autozomů, jeden mediocentrický (pár č. 1), dva metacentrické (páry č. 3 a 8), dva submetacentrické páry (č. 38 a 43) a čtyři subtelocentrické páry (č. 4, 5, 12 a 34).



Obr. 3: Karyologie zástupců rodu *Eresus*. a – diakineze samce *E. annulipes* ( $2n = 56$ ,  $X_1X_2X_3X_40$ ), 26 autozomových bivalentů a čtyři pohlavní chromozomy X (označeny šipkami), b – samčí mitotická metafáze druhu *E. balcanicus* ( $2n = 97$  chromozomů), c – metafáze mitotického dělení samce *E. sandaliatus*,  $2n = 97$ . Měřítka = 10  $\mu\text{m}$ .

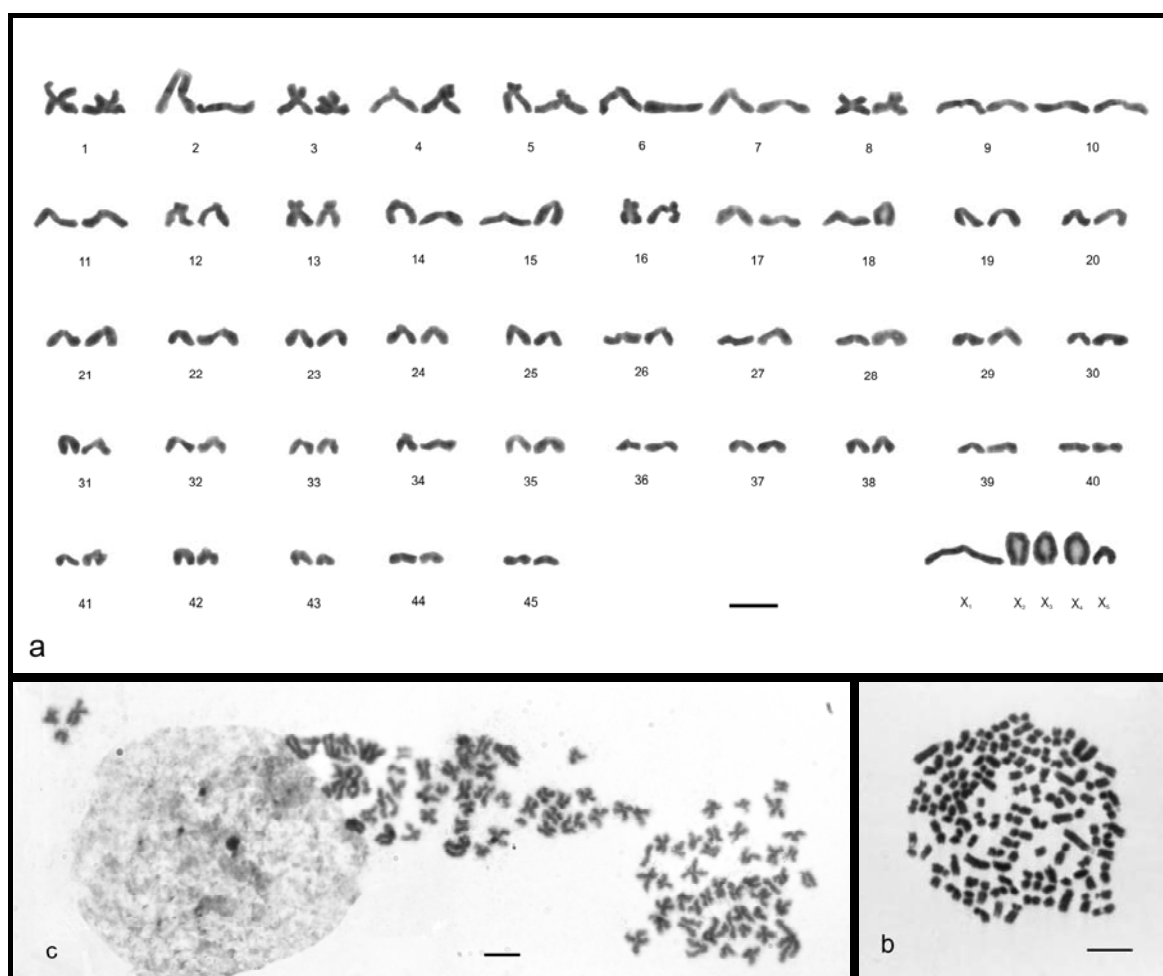


Obr. 4: Karyotypy samců rodu *Eresus*. a – samec *E. bulgaricus*. Karyotyp je tvořen 97 akrocentrickými chromozomy, systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ . Konstruováno z metafáze II, b – *E. kollari*,  $2n = 95$ . Autozomové páry 1, 2 a 6 jsou metacentrické, zbylé autozomy i pět chromozomů X je akrocentrických. Konstruováno z metafáze II. Měřítka = 10  $\mu m$ .

U posledního studovaného druhu rodu, *Eresus*. sp. nov z Izraele se zatím nepodařilo určit přesný počet chromozomů. Diploidní počet samců je buď 99 nebo 101 (obr. 5c). Systém pohlavních chromozomů je ale opět  $X_1X_2X_3X_4X_5Y$  pravděpodobně s akrocentrickou morfologií pohlavních chromozomů. Délkové poměry pohlavních chromozomů zjištěné v diakinezi jsou 2,16:1,9:1,85:1,68:1 ( $n = 2$ ). Na rozdíl od ostatních zástupců rodu dominují



v karyotypu tohoto druhu dvouramenné autozomy (obr. 5b). Z mitotických metafází a nekompletních metafází II lze usuzovat na přítomnost 30 - 40 párů dvouramenných chromozomů, na tomto rozptylu se podílí fakt, že v mitotických metafázích entelegyenních pavouků často nelze odlišit primární a sekundární konstriktce. Primární a sekundární konstriktce mají podobnou morfologii, chromatidy nejsou v oblastech ramen separovány, jak je tomu např. v mitózách savců. Optimální morfologii chromozomů nalezneme u těchto pavouků v metafázích II, kdy jsou chromatidy až na oblast centromery separovány, u *E. sp. nov.* nebyl však dostatek optimálně rozprostřených metafází II pro taková pozorování.

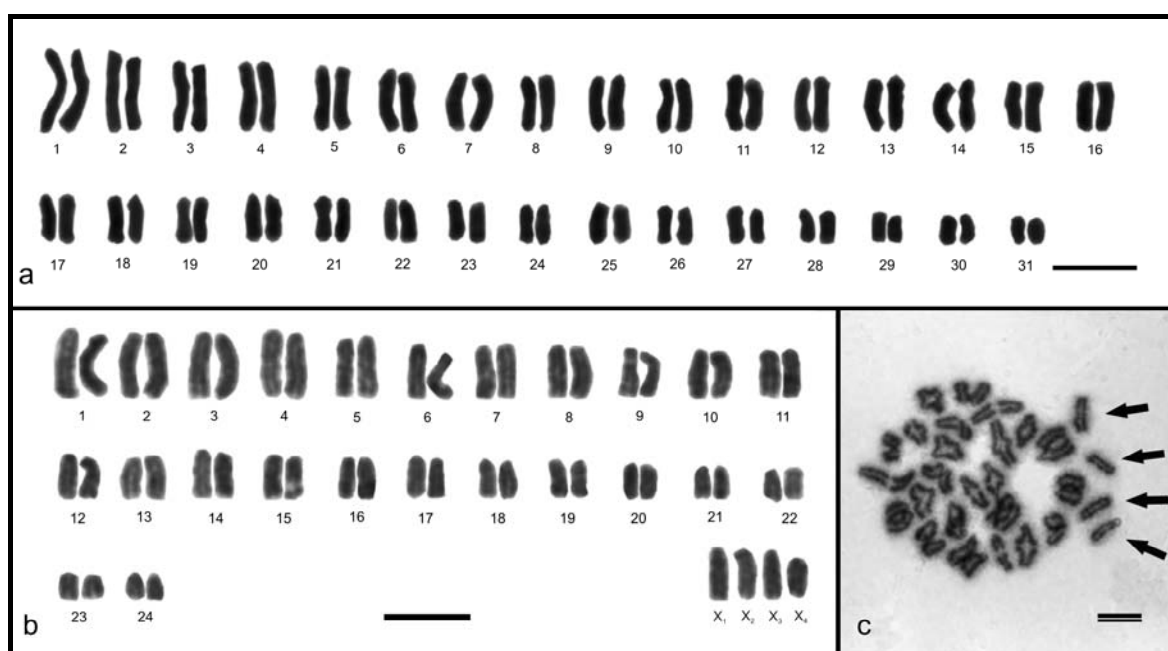


Obr. 5: Karyotypy *Eresus walckenaeri* a *E. sp. nov.* a - *E. walckenaeri*, karyotyp samce s 95 chromozomy. 9 párů autozomů je dvouramenných: mediocentrický pár (č. 1), dva metacentrické (č. 3 a 8), dva submetacentrické (č. 13 a 16) a čtyři subtelocentrické páry (č. 4, 5, 12 a 34). Karyotyp obsahuje pět akrocentrických chromozomů X. Vytvořeno z metafáze II, b - *E. sp. nov.*, nekompletní metafáze II; je patrná převaha dvouramenných chromozomů, c - *E. sp. nov.*, mitotická metafáze samce,  $2n = 99$  nebo 101. Výrazné primární konstriktce chromozomů ztěžovaly v některých případech odlišení dvouramenného chromozomu od dvou blízko sebe umístěných akrocentrických chromozomů. Měřítka = 10  $\mu$ m.

### 4.1.3 Ostatní zástupci čeledi Eresidae

Rod *Dorceus* byl v analýze zastoupen samicí druhu *Dorceus* cf. *fastuosus*, jejíž karyotyp byl tvořen 62 chromozomy (obr. 6a), všechny chromozomy jsou akrocentrické. Počet pohlavních chromozomů se nepodařilo zjistit, samci nebyli k dispozici (jedná se o vzácné pavouky s málo známým způsobem života).

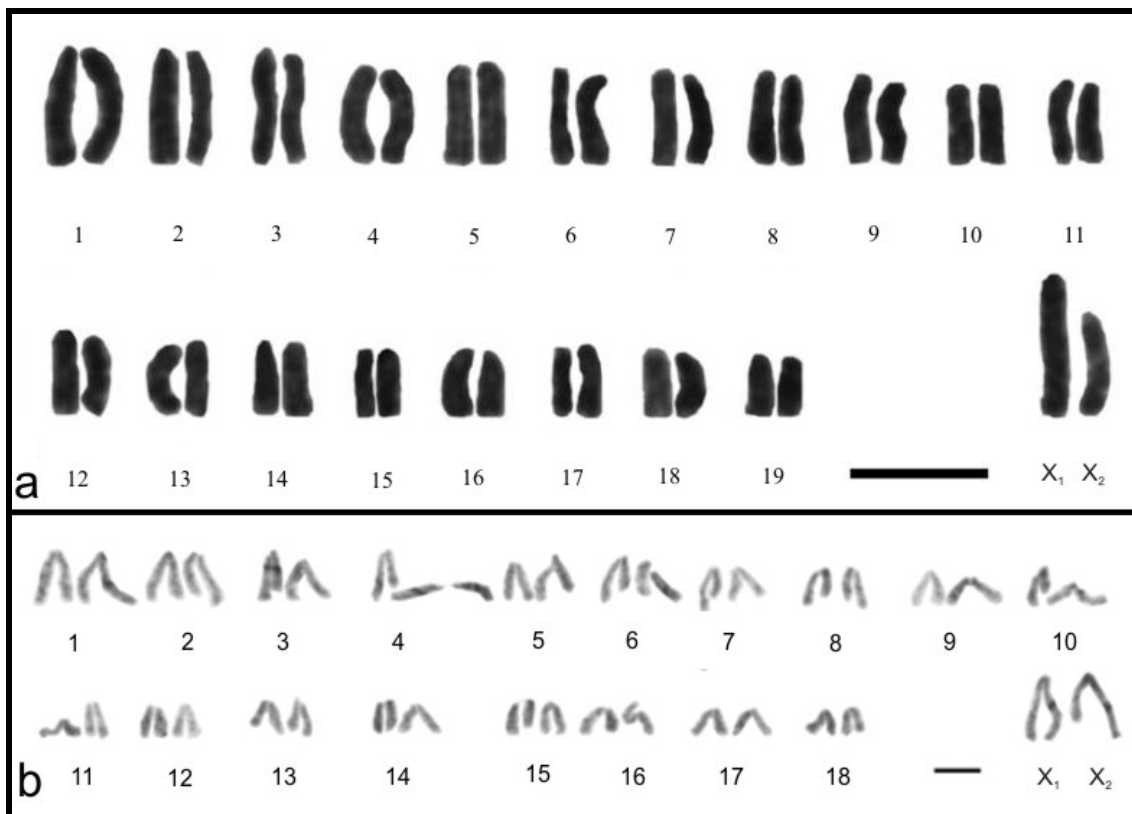
Samčí karyotyp *Adonea fimbriata*, zástupce monotypického rodu *Adonea*, je složen z 52 akrocentrických chromozomů (obr. 6b). Samčí gonozomový komplement je tvořen čtyřmi pohlavními chromozomy X (obr. 6c) (vzájemné poměry gonozomů byly v diakinezi 1,3:1,25:1,02:1,  $n = 2$ ).



Obr. 6: Karyologie zástupců rodů *Dorceus* a *Adonea*. a – karyotyp samice *Dorceus* cf. *fastuosus* složený z 62 chromozomů, sestaveno z mitotické metafáze, b – samčí karyotyp druhu *Adonea fimbriata*,  $2n = 52$   $X_1X_2X_3X_40$ , sestaveno z mitotické metafáze, c – diakineze samce *Adonea fimbriata*, 24 autozomálních bivalentů; čtyři nepárující chromozomy X jsou označeny šipkami. Měřítka = 10  $\mu$ m.

Oba jihoafrické terestrické rody *Gandanameno* a *Dresserus* byly zastoupeny jedním druhem. Karyotyp samce *Dresserus kannemeyeri* je složen ze 40 chromozomů, systém chromozomového určení pohlaví je opět  $X_1X_20$  (obr. 7a). Chromozom  $X_1$  tohoto druhu byl v průměru o deset procent delší než  $X_2$  (diakineze,  $n = 3$ , anafáze I,  $n = 1$ ). Samčí karyotyp druhu *Gandanameno* sp. byl tvořen 38 chromozomy, systém pohlavních chromozomů byl

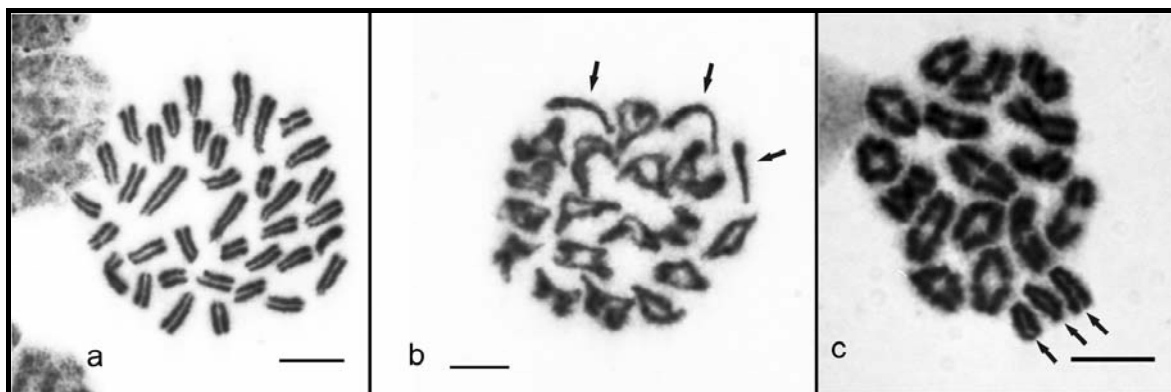
$X_1X_20$  (obr. 7b). Délkový poměr pohlavních chromozomů byl v diakinezi 1,16:1 ( $n = 2$ ). Chromozomy obou druhů byly akrocentrické.



Obr. 7: Karyogramy jihoafrických zástupců čeledi Eresidae. a – samec *Dresserus kannemeyeri*,  $2n = 40$ ,  $X_1X_20$ , konstruováno z mitotické metafáze, b – samec *Gandanemeno* sp.; karyotyp tvořen 38 akrocentrickými chromozomy, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$ ; konstruováno z metafáze II. Měřítka = 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.4 Ostatní Eresoidea

Karyotypy čeledi Eresidae byly porovnány se zástupci dalších dvou čeledí nadčeledi Eresoidea. Samčí karyotyp druhu *Uroctea durandi* (Oecobiidae) se skládá z 37 chromozomů (obr. 7a). Systém chromozomového určení pohlaví je tvořen třemi chromozomy X (obr. 8b). Poměry délek pohlavních chromozomů jsou v diakinezi 1,5:1,22:1 ( $n = 3$ ). Karyotyp samce druhu *Hersiliola punctuata* (Hersiliidae) je tvořen 35 chromozomy, chromozomové určení pohlaví je  $X_1X_2X_30$  (obr. 8c). Délkové poměry gonozomů jsou v diakinezi 1,18:1,05:1 ( $n = 2$ ). U obou druhů byly všechny chromozomy akrocentrické.

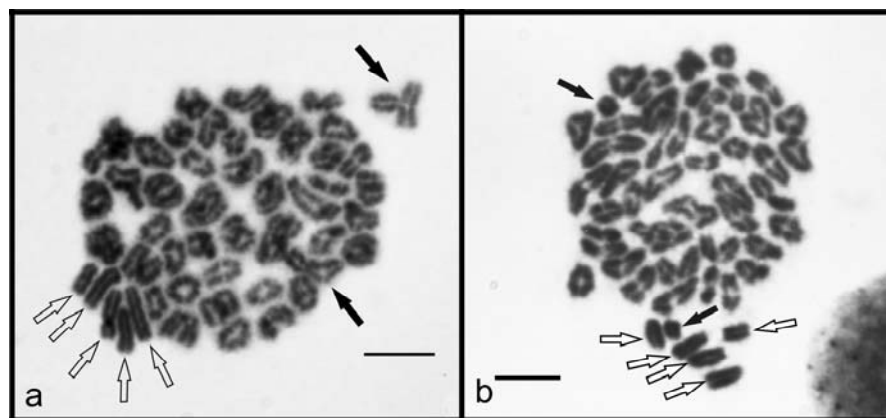


Obr. 8: Chromozomy zástupců čeledí Oecobiidae a Hersiliidae. a - mitotická metafáze samce *U. durandi* ( $2n = 37$ ), b - samec *U. durandi*, diakineze, šipky označují tři pohlavní chromozomy X, c - *H. punctuata* samec ( $2n = 35, X_1X_2X_30$ ), metafáze I tvořená 16 autozomovými bivalenty a třemi pohlavními chromozomy X (šipky). Měřítko = 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2 Chování chromozomů v průběhu samčího meiotického dělení

Průběh samčí meiózy se nepodařilo prostudovat pouze u rodu *Dorceus*, u tohoto rodu se nepodařilo získat samce, a u druhu *E. balcanicus*, kde byly pozorovány pouze mitozy. U *S. dufouri* a některých druhů rodu *Eresus* (*E. annulipes*, *E. balcanicus*, *E. sandaliatus* a *E. sp. nov.*) nebyl zachycen celý průběh meiotického dělení. Pozorované etapy těchto druhů však nijak nevybočují z charakteristiky meiózy a z charakteristiky chování pohlavních chromozomů tak, jak je podána níže pro ostatní zástupce čeledi Eresidae.

Párování a segregace chromozomů v meióze samců probíhaly většinou standardním způsobem. Homologické autozomy tvořily standardní bivalenty. Výjimkou byly pouze dva páry multivalentů složené ze tří chromozomů, které byly pozorovány u jednoho exempláře druhu *E. walckenaeri* (lokalita Agios Georgios, pohoří Pindos, Řecko) (obr. 9a). Tyto trivalenty byly tvořeny dvěma dvouramennými chromozomy a jedním akrocentrickým. U druhu *E. bulgaricus* byl v metafázi I pozorován předčasný rozpad jednoho bivalentu (obr. 9b). Je zajímavé, že se jeden chromozom tohoto bivalentu vyskytoval často v blízkosti pohlavních chromozomů.



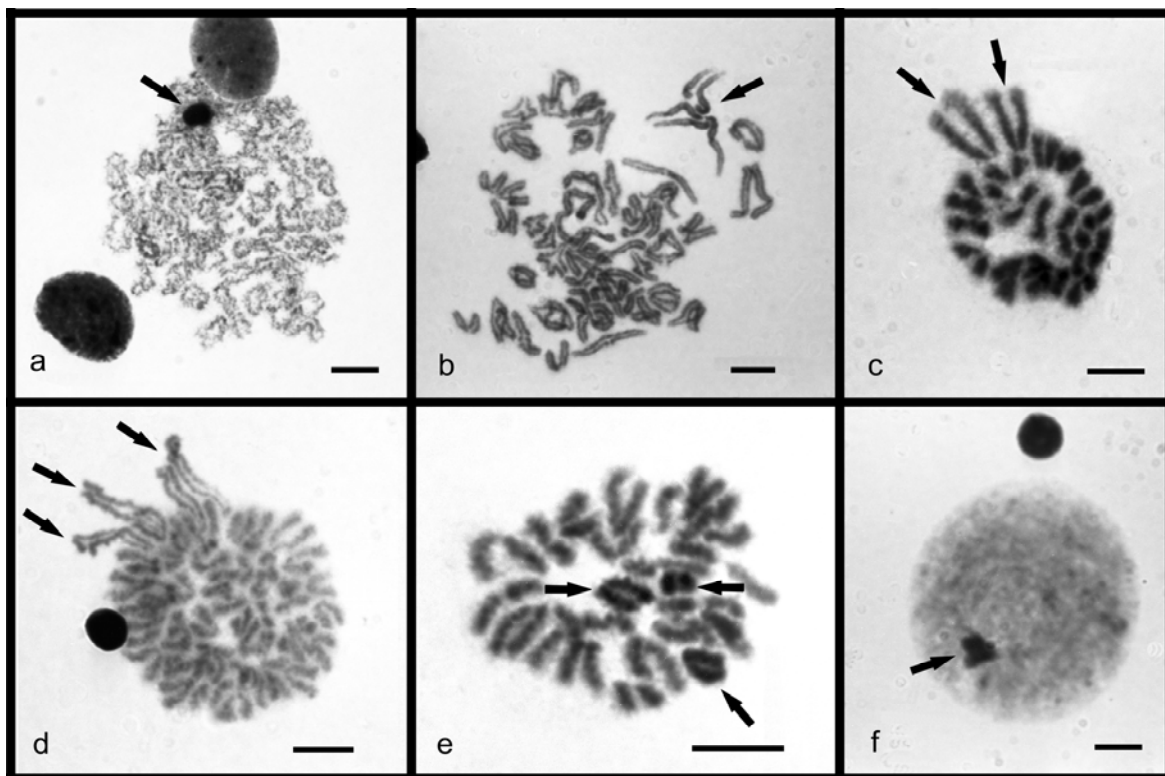
Obr. 9: Odchylky v meiotickém dělení u zástupců rodu *Eresus*. a – diakineze samce *E. walckenaeri* z řeckého pohoří Pindos. Plnými šipkami označen pár trivalentů, na okraji figury leží pět pohlavních chromozomů X (prázdné šipky), b – diakineze samce *E. bulgaricus*; jeden z chromozomů předčasně se rozpadajícího bivalentu (plné šipky) byl často nacházen v blízkosti pohlavních chromozomů (označeny prázdnými šipkami). Měřítka = 10  $\mu$ m.

Chování pohlavních chromozomů v samčí meióze stepníků lze zobecnit do následujícího schématu. Pohlavní chromozomy spiralizovaly na začátku profáze I více než autozomy a vykazovaly tak pozitivní heteropyknózu, nástup heteropyknózy se lišil mezi exempláři stejného druhu i mezi stejnými jedinci. Pozitivní heteropyknóza se objevovala většinou počátkem pachytene (obr. 10a). U rodu *Stegodyphus* párovaly gonozomy v profázi I většinou na okraji figury. U druhu *S. lineatus* bylo pozorováno párování gonozomů ve středu figury, gonozomy byly silně heteropyknotické ještě v průběhu diplotene. Tři pohlavní chromozomy tvořily při párování v diplotene strukturu podobnou trojlístku, ve které byly asociovány svými konci (obr. 10b), podobný způsob párování byl pozorován i u  $X_1$  a  $X_2$  u druhu *Dresserus kannemeyeri* (obr. 10c). S velkou pravděpodobností se podobným způsobem chovají čtyři pohlavní chromozomy druhu *A. fimbriata* a to v některých pachytene, kvůli vyšší spiralizaci gonozomů v této fázi to však nelze tvrdit s jistotou. U ostatních studovaných druhů tento typ párování nebyl pozorován.



Obr. 10: Profáze I samců čeledi Eresidae, a – pachytene *A. fimbriata*, šipky označují pozitivně heteropyknotické pohlavní chromozomy, b – diplotene *S. lineatus*, šipka míří na tři pozitivně heteropyknotické chromozomy X, které párují svými konci a vytváří strukturu ve tvaru „trojlístku“, c – diakineze *D. kannemeyeri*, dva chromozomy X (šipka) párují obdobným způsobem jako u předešlého druhu.. Měřítko = 10  $\mu$ m.

U zástupců rodu *Eresus* se systémem  $X_1X_2X_3X_4X_50$  v diplotene tvořily pohlavní chromozomy vysoce kompaktní sex vezikul umístěný obvykle uprostřed figury (obr. 11a). V některých diakinezích vytvářely při párování rozetku. Z toho lze usuzovat, že párují pomocí centromer (obr. 11b). U většiny studovaných zástupců čeledi Eresidae (kromě druhů *S. mimosarum*, *S. dumicola*, *S. sarasinorum*, *S. dufouri* a *Adonea fimbriata*) přetrvávala odlišitelnost pohlavních chromozomů od autozomů do pozdějších stádií meiotického dělení. V metafázi I byla patrna slabá pozitivní heteropyknóza. Během anafáze I byla znatelná silná despiralizace pohlavních chromozomů, která se projevovala jejich větší délkou (obr. 11c,d). Despiralizace často přetrvávala až do časně metafáze II, kdy se postupně měnila v pozitivní heteropyknózu (obr. 11d). V anafázi II byla despiralizace a negativní heteropyknóza gonozomového komplementu pozorována pouze výjimečně, v některých figurách druhů *S. lineatus*, *A. fimbriata* a *E. walckenaeri*. Pozitivní heteropyknóza pohlavních chromozomů byla patrna taktéž v interfázi (obr. 11e).



Obr. 11: Vybrané figury samčího meiotického dělení čeledi Eresidae, a – *E. bulgaricus*, časná diplotene; pohlavní chromozomy tvoří silně heteropyknotický sex vesikul (šipka), b – *E. walckenaeri* časná diakineze; pohlavní chromozomy párují centromerami (označeny šipkou), c – *D. kannemeyeri*, anafáze I; dva pohlavní chromozomy (šipky) jsou výrazně delší než autozomy, d – *E. walckenaeri*, anafáze I; gonozomů jsou značně delší v důsledku jejich despiralizace (označeny šipkou), e – *S. lineatus* metafáze II; šipkami označeny tři pozitivně heteropyknotické chromozomy X, f – *D. kannemeyeri*, interfáze, dva pohlavní chromozomy (šipka) spolu asociují a jsou pozitivně heteropyknotické. Měřítka = 10  $\mu$ m.

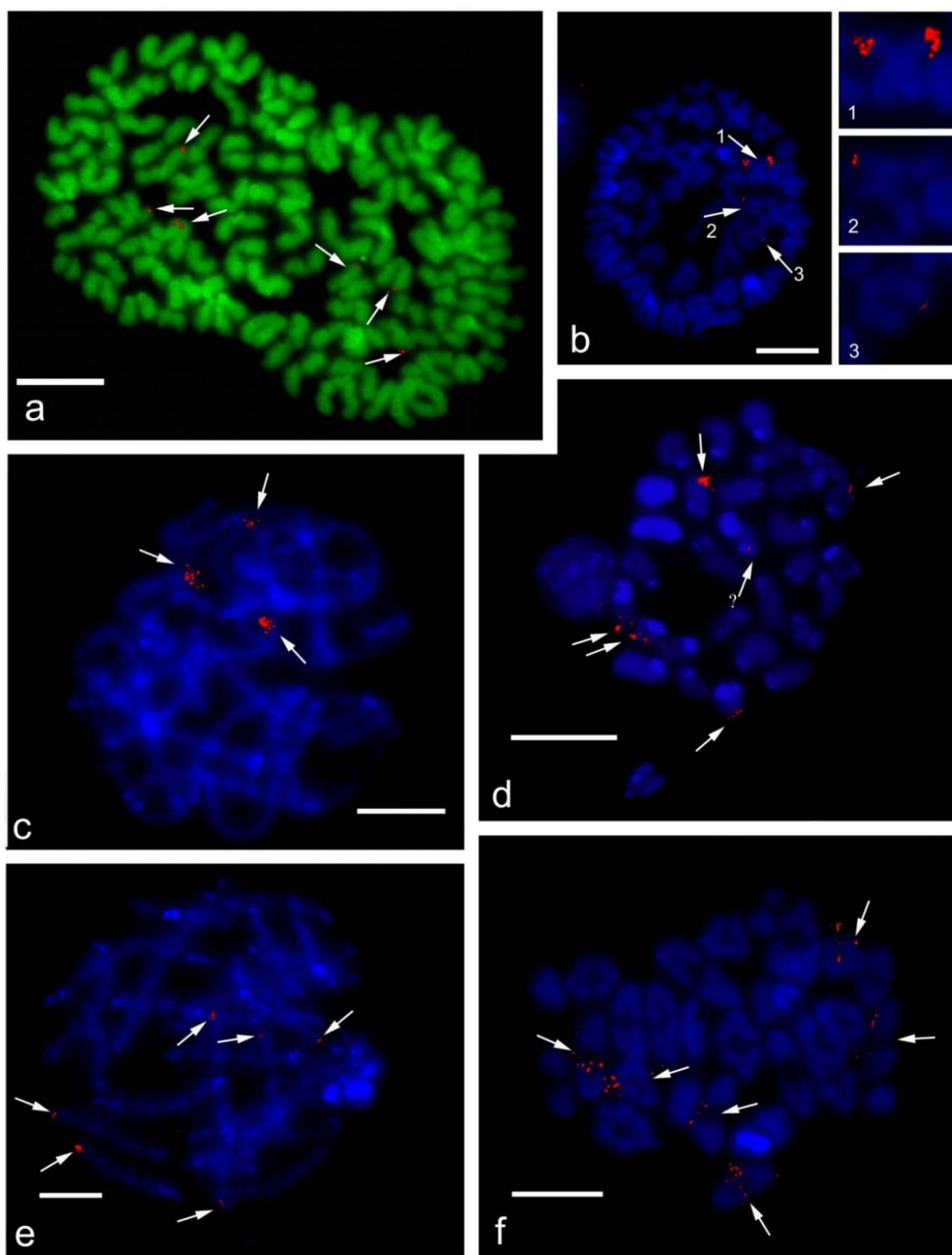
U zkoumaných zástupců čeledí Oecobiidae (*U. durandi*) a Hersiliidae (*H. punctuata*) byly pohlavní chromozomy také pozitivně heteropyknotické v meióze samců, a to od pachytene do metafáze I. V pozdějších etapách meiotického dělení nebyly gonozomy těchto druhů svým chováním již odlišitelné od autozomů.

### 4.3 Vizualizace nukleolárních organizátorů

U vybraných druhů byla stanovena poloha nukleolárních organizátorů v karyotypu, a to vizualizací nukleolárních klastrů rDNA pomocí FISH s nepřímo značenou sondou. Byly vybrány tři druhy, a to tak aby reprezentovaly zjištěný rozsah diploidních počtů. Jednalo se o samce druhů *S. mimosarum* (JAR,  $2n = 30$ ), *A. fimbriata* ( $2n = 52$ ) a *E. kollari* ( $2n = 95$ ). Karyotyp druhu *E. kollari* obsahuje tři páry nukleolárních organizátorů (obr. 12a). Jeden z nich je lokalizován na koncích ramének páru metacentrických autozomů, druhý se nachází na distálních koncích krátkých ramének jiného metacentrického autozomového páru. Poslední pár NORů je umístěn v distální části akrocentrického páru autozomů (obr. 12b). U druhu *S. mimosarum* (JAR) byly detekovány 3 páry nukleolárních organizátorů (obr. 12c,d), které se nacházely na distálních koncích třech pár autozomů. *A. fimbriata* nese NORy na pěti až šesti autozomálních párech (obr. 12e,f). U žádného ze zkoumaných druhů nebyly zjištěny nukleolární organizátory na pohlavních chromozomech.

FISH vizualizující nukleolární organizátory nebyla dosud u pavouků aplikována, stanovení přesného počtu nukleolárních organizátorů bylo tedy ztíženo ne zcela propracovanou metodikou. Negativním aspektem, který ovlivňoval přesnost výsledků, bylo zejména velké pozadí patrně způsobené neodmytou sondou. V počáteční fázi zavádění metodiky činila problémy také destrukce figur v důsledku příliš dlouhého působení proteáz (byly používány k odstranění zbytků cytoplazmy z chromozomových figur) a špatná vazba sondy (tj. hybridizace pouze na jednu chromatidu chromozomu, hybridizace pouze k některým NORům). Zejména u druhů s vysokým počtem chromozomů nelze proto vyloučit přítomnost dalších menších nukleolárních organizátorů s nižším počtem transkripčních jednotek a tedy nižší intenzitou signálů, které mohly zanikat na pozadí. Při použití sond z příbuzných a nepříbuzných druhů (*E. kollari* a *Pholcus phalangoides*, Pholcidae) nebyl pozorován rozdíl v intenzitě signálů jakož i v pozadí a kvalitě nasedání sondy.





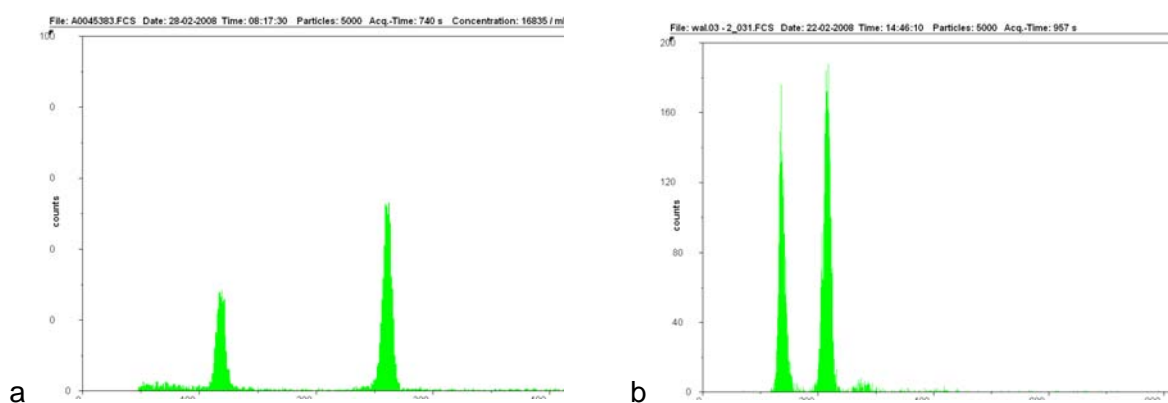
#### 4.4 Měření obsahu DNA a relativního zastoupení AT/GC párů v genomu

U samic čeledi Eresidae se hodnoty C pohybovaly od 2,54 pg (*S. lineatus*) do 6,08 (*D. cf. fastuosus*). Největší genom z měřených druhů měl zástupce čeledi Oecobiidae, *U. durandi* (hodnota C = 7,58 pg). Průměrný procentuální obsah AT párů bází činil u samic studovaných druhů čeledi Eresidae 68,5 %, genom byl tedy bohatší na AT páry. Převaha AT párů bází v genomu se projevovala falešně vysokými hodnotami obsahu DNA při měření obsahů pomocí DAPI při použití standardů bohatších na GC páry (obr. 13). Velikosti genomů (vyjádřené hodnotami C) a obsahy AT/GC párů u jednotlivých druhů jsou uvedeny v tab. 5.

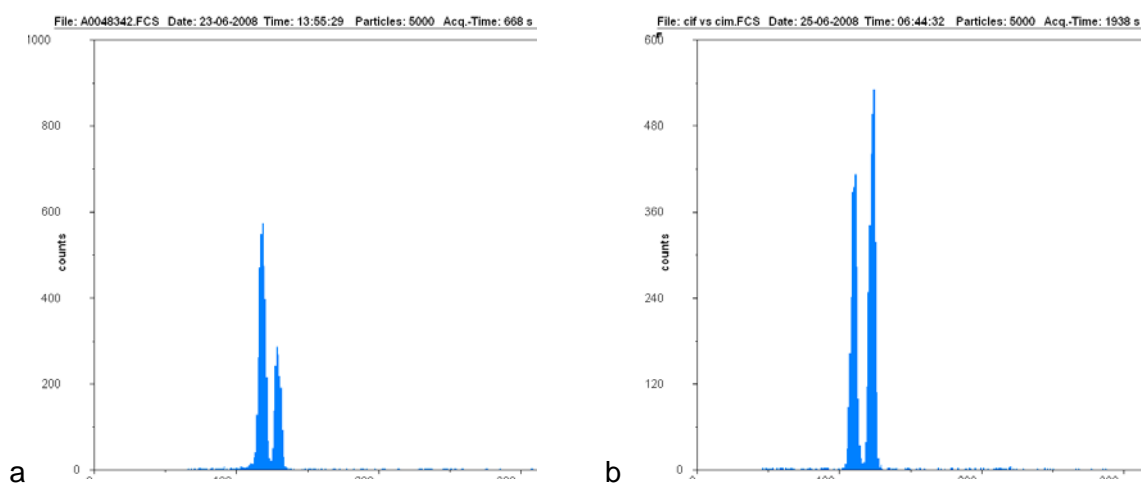
Druh a pohlaví	Hodnota C (pg)	Směrodatná odchylka hodnoty C pro druh od hodnot C u měřených jedinců druhu (%)	Obsah AT bazí v genomu (%)	Průměrný CV při měření na PI CV standardu/ CV vzorku	Průměrný CV při měření na DAPI CV standardu/ CV vzorku
<i>A. fimbriata</i> ♀	4,04	1,38	70,06	4,97/5,03	1,75/1,52
<i>A. fimbriata</i> ♂	3,73	7,38	69,77	5,97/5,12	1,65/1,92
<i>Dorceus. cf. fastuosus</i> ♀	6,08	*	68,45	4,75/3,82	2,71/1,82
<i>D. kannemeyeri</i> ♀	4,19	5,22	65,38	4,36/4,75	2,15/2,07
<i>Eresus</i> sp. nov. ♀	5,50	3,29	67,80	4,81/4,74	2,28/1,85
<i>E. annulipes</i> ♀	4,67	3,40	67,91	5,11/4,63	1,85/1,67
<i>E. bulbaricus</i> ♀	4,73	2,87	66,96	4,61/4,85	2,62/2,23
<i>E. kollari</i> ♀	4,19	2,13	69,32	5,54/6,80	1,81/1,99
<i>E. kollari</i> ♂	3,85	2,64	69,87	5,19/5,97	1,91/1,96
<i>E. walckenaeri</i> ♀	5,33	3,47	65,11	4,51/4,15	2,69/2,41
<i>S. dunicola</i> ♀	4,02	1,75	67,85	3,94/4,21	2,45/2,20
<i>S. lineatus</i> ♀	2,54	1,98	70,58	5,18/4,87	1,97/2,06
<i>S. mimosarum</i> (JAR) ♀	3,13	4,74	68,84	4,54/3,84	2,04/2,01
<i>S. sarasinorum</i> ♀	3,47	2,56	70,11	4,66/5,24	3,02/3,05
<i>Gandanameno</i> sp. (De Hoop) ♀	2,97	*	71,94	5,15/4,77	1,91/1,45
<i>Gandanameno</i> sp. (Kapské Město) ♀	3,39	*	68,43	5,36/4,97	1,67/1,58
<i>U. durandi</i> ♀+	7,58	2,56	69,13	4,80/4,05	2,45/1,84

Tab. 5. Obsahy DNA a procentuální zastoupení bazí v genomech zástupců nadčeledi Eresoidea, průtoková cytometrie, zeleně podbarveny - výsledné hodnoty C a procentuální zastoupení AT v genomu, červeně odlišeny - CV standardů + - zástupce čeledi Oecobiidae, \* - měřen jen jeden jedinec.

U druhů *A. fimbriata* a *E. kollari* byl měřen obsah DNA u obou pohlaví. Rozdíl mezi dvojnásobky hodnot C samců a samic (odpovídá obsahu DNA pohlavních chromozomů v genomu samců) byl 0,62 pg u *A. fimbriata* a 0,68 pg u *E. kollari*. Tyto pokusy byly prováděny ve dvou variantách. Nejprve byl měřen obsah DNA u obou pohlaví zvlášť s rostlinným standardem. Pro lepší ilustraci rozdílné velikosti genomů obou pohlaví byla pak provedena měření samec vs. samice (obr. 14).



Obr. 13: Samice *E. walckenaeri*, obsah DNA; standardem byly mužské leukocyty. V důsledku nižšího obsahu GC proti standardu se vrcholy histogramů jeví při měření pomocí AT specifického barviva (DAPI) (a) navzájem vzdálenější než u nespecifického, interkalačního barviva (PI) (b).



Obr. 14: Porovnání velikostí genomu samce a samice, měřeno pomocí DAPI. Nižší vrcholy histogramů (více vlevo) náleží samcům. a - *A. fimbriata*, b - *E. kollari*.

## 5 Diskuze

### 5.1 Základní charakteristika karyotypů a genomů nadčeledi Eresoidea

#### 5.1.1 Základní charakteristika karyotypů čeledi Eresidae

Předložená práce se zabývá analýzou karyotypu a obsahu DNA u vybraných zástupců nadčeledi Eresoidea, a to s cílem získat základní představu o karyotypové evoluci čeledi Eresidae. Dosud byly popsány karyotypy třech druhů čeledi Eresidae (tab. 6). Autorem této práce bylo nově studováno dalších 16 druhů a dva revidovány (z toho 3 v rámci bakalářské práce a 15 v předložené diplomové práci). Z tabulky č. 6 je patrná mimořádná diverzita diploidních počtů stepníkovitých ( $2n\sigma$  24-97, resp. 99-101?), kteří jsou tak z hlediska karyotypů velmi diverzifikovanou živočišnou čeledí. Nejvyšší diploidní počty výrazně překračují nejvyšší dosud známý diploidní počet chromozomů u entelegynních pavouků (*Araneus ventricosus* z čeledi Araneidae,  $2n\sigma = 49$ , WANG *et al.* 1993). Zástupci rodu *Eresus* s  $2n > 95$  se tedy stávají araneomorfními pavouky s nejvyššími počty chromozomů. Stepníkovití vykazují rovněž pro entelegynní pavouky neobvyklou diverzitu systému pohlavních chromozomů. Kromě systému  $X_1X_20$ , který je zřejmě ancestrální pro všechny pavouky (SUZUKI 1954), byly u stepníkovitých objeveny ještě systémy se třemi, čtyřmi a pěti chromozomy X u samce. Systém  $X_1X_2X_30$  vznikl nezávisle u různých čeledí pavouků ze systému  $X_1X_20$ , a to zřejmě nondisjunkcemi (POSTIGLIONI a BRUM-ZORILLA 1981). Dosud byl nalezen u 9 % karyotypovaných druhů pavouků z devíti čeledí (CHEN 1999, ARAUJO *et al.* 2005). Systém  $X_1X_2X_3X_40$  je u pavouků ojedinělý, byl nalezen pouze u třech druhů z čeledí maloočkovitých a čelistnatkovitých (DATTA a CHATTERJEE 1983). Pohlavní systém  $X_1X_2X_3X_4X_50$  nebyl dosud u pavouků objeven. S výjimkou některých systémů s neopohlavními chromozomy (ROWELL 1985, KRÁL 2007, SHARP a ROWELL 2007) se jedná o nejsložitější gonozomový systém u araneomorfních pavouků.

Druh, autor popisu karyotypu	2n*	Systém pohlavních chromozomů	Počet párů dvouramenných autozomů	Hodnota C (pg)* **
+ <i>Stegodyphus sarasinorum</i> (severní Indie) <sup>3</sup>	24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	?
+ <i>S. dunicola</i> <sup>5,7</sup>	26	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	4,02
+ <i>S. mimosarum</i> (Tanzanie) <sup>6</sup>	24	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	?
<i>S. africanus</i> <sup>6,7</sup>	28 /30	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	?
<i>S. dufouri</i> <sup>7</sup>	30	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	?
+ <i>S. mimosarum</i> (JAR) <sup>7</sup>	30	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	3,13
+ <i>S. sarasinorum</i> (střední a jižní Indie) <sup>2,4,6,7</sup>	30	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	3,47
<i>S. pacificus</i> <sup>1</sup>	30	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	?
<i>Gandanameno</i> sp. <sup>7</sup>	38	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	2,97/3,39++
<i>Dresserus kannemeyeri</i> <sup>7</sup>	40	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	0	4,19
<i>S. lineatus</i> <sup>7</sup>	43	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> 0	0	2,54
<i>Adonea fimbriata</i> <sup>7</sup>	52	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> 0	0	4,04♀/3,73♂
<i>Dorceus</i> cf. <i>fastuosus</i> <sup>7</sup>	62♀	?	?	6,08
<i>Eresus annulipes</i> <sup>7</sup>	56	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> 0	0	4,67
<i>Eresus kollari</i> <sup>7</sup>	95	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> 0	3	4,19♀/3,85♂
<i>Eresus walckenaeri</i> <sup>7</sup>	95	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> 0	9	5,33
<i>Eresus balcanicus</i> <sup>7</sup>	97	?	?	?
<i>Eresus bulgaricus</i> <sup>7</sup>	97	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> 0	0	4,73
<i>Eresus sandaliatus</i> <sup>7</sup>	97	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> 0	převládají jednoramenné autozomy	?
<i>Eresus</i> sp. nov. <sup>7</sup>	99-101	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> 0	30-35	5,50

Tab. 6: Základní karyotypová data zástupců čeledi Eresidae. \* jedná se o samce, není-li uvedeno jinak, \*\* jedná se o samice, pokud není uvedeno jinak, + sociální druh, ++ deterninováno pouze do rodu; byly měřeny dvě samice ze vzdálených lokalit, jež mohou patřit k různým druhům. <sup>1</sup>SHARMA a SINGH 1957, <sup>2</sup>BOLE-GOWDA 1958, <sup>3</sup>MITTAL 1970, <sup>4</sup>SHARMA a PARIDA 1987, <sup>5</sup>AVILÉS *et al.* 1999, <sup>6</sup>bakalářská práce autora, <sup>7</sup>tato práce.

Chování pohlavních chromozomů stepníkovitých v samčí meioze vykazuje mnohé rysy typické pro ostatní entelegynní pavouky, např. pozitivní heteropyknozu v profázi I. Zajímavý je typ párování nalezený v diplotene u druhů *S. lineatus* a *D. kannemeyeri* a předpokládaný u *A. fimbriata*, kdy se párování účastní oba konce pohlavních chromozomů. Tento typ párování nebyl u jiných entelegynních pavouků nalezen, podobné párování se však vyskytuje u některých skupin primitivních araneomorfních pavouků (KRÁL *et al.* 2006). Může se jednat o tento typ párování nebo jeho pozůstatek. Párování pohlavních chromozomů pomocí centromer v diakinezích rodu *Eresus* je naopak podobné tomu, které je nalézáno u většiny entelegynních pavouků, jejichž chromozomy párují nebo asociují centromerami (SUZUKI 1954). Despiralizace pohlavních chromozomů v anafázi I typická pro většinu druhů čeledi se vyskytuje pouze u několika málo pavoučích skupin (KRÁL 1994).

### 5.1.2 Úvod do evoluce karyotypu čeledí Hersiliidae a Oecobiidae

Karyotypy dvou příbuzných čeledí, Oecobiidae a Hersiliidae, jsou v porovnání s diverzitou zjištěnou u stepníkovitých poměrně konzervativní (tab. 7). V obou čeledích nejsou známi zástupci s dvouramennými chromozomy, karyotypy jsou tvořeny pouze akrocentrickými chromozomy. Systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  nebo  $X_1X_2X_30$ . Karyotyp *Hersiliola punctuata* má oproti zástupci rodu *Hersilia* (SUZUKI 1954) o dva páry autozomů více. Karyotyp *Hersiliola punctuata* se liší dále přítomností chromozomu  $X_3$  (tab. 7). Ve fylogenetických analýzách čeledi Hersiliidae je rod *Hersiliola* považovaný za primitivní (BAEHR a BAEHR 1993), lze se tedy domnívat, že se v karyotypové evoluci této čeledi vyskytuje tendence ke snižování  $2n$ , která je typická pro většinu entelegynních skupin (SUZUKI 1954).

Oba doposud studované druhy rodu *Uroctea* z čeledi Oecobiidae (SUZUKI 1954, tato práce) výrazně převyšují svým  $2n$  druh *Oecobius putus* téže čeledi (MITTAL 1983, SRISTAVA a SHUKLA 1986) (tab. 7). S přihlédnutím k předpokládanému ancestrálnímu karyotypu u entelegynních pavouků (KRÁL 2006), který odpovídá stavu u *U. compactilis*, se karyotyp rodu *Oecobius* jeví jako odvozený.

Čeď	druh, autor popisu karyotypu	2n♂	systém pohlavních chromozomů
Hersiliidae	<i>Hersilia savignyi</i> <sup>1</sup>	30	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0
Hersiliidae	<i>Hersiliola punctuata</i> <sup>5</sup>	35	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> 0
Oecobiidae	<i>Oecobius putus</i> <sup>3,4</sup>	25	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> 0
Oecobiidae	<i>Uroctea durandi</i> <sup>5</sup>	37	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> 0
Oecobiidae	<i>Uroctea compactilis</i> <sup>2</sup>	42	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0

Tab. 7: Karyotypy zástupců čeledi Hersiliidae a Oecobiidae; všechny druhy mají akrocentrickou morfologii chromozomů. <sup>1</sup>BOLE GOWDA 1952, <sup>2</sup>SUZUKI 1954, <sup>3</sup>MITTAL 1983, <sup>4</sup>SRISTAVA a SHUKLA 1986, <sup>5</sup>tato práce.

### 5.1.3 Základní charakteristika genomů nadčeledi Eresoidea

Tato studie se vůbec jako první zabývala velikostí genomu u pavouků nadčeledi Eresoidea a sledováním poměru AT/GC bazí v genomu pavouků. V rámci čeledi Eresidae se objevuje značná diverzita hodnoty C, a to od 2,54 do 6,08 pg u samic (tab. 5). *U. durandi* je pavoukem s nejvyšší hodnotou C (C = 7,58 pg). Velikost genomu v rámci eukaryot většinou nesouvisí s komplexitou organismů, tento fenomén zvaný paradox hodnoty C (THOMAS 1971) často souvisí se zvětšováním genomu v důsledku zmnožování nekódující DNA (GREGORY 2005). Poměr AT/GC párů bazí byl na rozdíl od obsahů DNA mnohem konstantnější, pohyboval se od 65,11 do 71,94 % AT párů (tab. 5). Průměrný obsahu AT párů bazí byl u samic stepníkovitých 68,5 %, genom zástupců nadčeledi Eresoidea je tedy bohatší na AT páry. Co se týče obsahu bazí u pavouků, nebyly dosud publikovány žádné výsledky. Naše nepublikované výsledky na dvou nepříbuzných čeledích, Dysderidae a Sparassidae, však naznačují, že převaha AT v genomu araneomorfních pavouků může být obecným jevem. Nižších CV se dosahovalo při měření pomocí DAPI. Jelikož vzorky pro měření obsahu DNA byly připravovány zároveň a stejným způsobem pro oba použité fluorochromy, lze se domívat, že je tomu tak proto, že s PI interagují látky obsažené v hemolymfě pavouků. Mezi jednotlivými jedinci stejného druhu nebyla zjištěna podstatná vnitrodruhová variabilita, výjimkou byli poze dva jedinci rodu *Gandanameno*, kteří pocházeli ze vzdálených lokalit a mohou patřit k odlišným druhům.



## 5.2 Rekonstrukce karyotypové evoluce čeledi Eresidae

Pro rekonstrukci původního karyotypu čeledi lze využít karyotypových dat, která byla nashromážděna u ostatních skupin entelegynních pavouků. Přes velkou druhovou diverzitu jsou entelegynní pavouci z karyotypového hlediska konzervativní skupinou. Na základě studia karyotypové evoluce entelegynních pavouků lze předpokládat, že se ancestrální karyotyp entelegynních pavouků nacházel poblíž horní hranice jejich diploidních počtů (Král *et al.* 2006). Nejčastěji nalézaným karyotypem s vysokým  $2n$  u samců entelegynních pavouků je 42,  $X_1X_20$ , tento karyotyp se také vyskytuje u většiny primitivních entelegynních skupin.  $2n♂ = 42$ ,  $X_1X_20$  s akrocentrickou morfologií chromozomů se proto považuje za ancestrální karyotyp entelegynních pavouků (KRÁL *et al.* 2006).

Karyotyp některých zástupců nadčeledi Eresoidea je shodný (*U. compactilis*,  $2n♂ = 42$ ,  $X_1X_20$ , Oecobiidae, SUZUKI 1954) nebo se velmi blíží předpokládanému ancestrálnímu karyotypu entelegynních pavouků (*S. lineatus*,  $2n♂ = 43$ ,  $X_1X_2X_30$ , *Dresserus kannemeyeri*,  $2n♂ = 40$ ,  $X_1X_20$ , Eresidae). Předpokládám tedy, že samčí ancestrální karyotyp nadčeledi Eresoidea i čeledi Eresidae byl tvořen 42 akrocentrickými chromozomy (příčemž systém chromozomového určení pohlaví byl  $X_1X_20$ ), popř. byl takovému karyotypu velmi blízký. Tento karyotyp je také pravděpodobný vzhledem k bazální pozici nadčeledi Eresoidea v rámci entelegynních pavouků (CODDINGTON a LEVI 1991). Karyotyp *S. lineatus* lze snadno odvodit z karyotypu 42,  $X_1X_20$  nondisjunkcí jednoho chromozomu X.

### 5.2.2 Další evoluce karyotypu stepníků

Z evolučního hlediska lze tedy čeleď Eresidae rozdělit na skupinu s  $2n♂ \leq 43$  a na skupinu s  $2n > 43$ , v karyotypové evoluci obou skupin se mohly uplatňovat odlišné zákonitosti.

Do první skupiny ( $2n♂ \leq 43$ ) řadím rody *Dresserus*, *Gandanameno* a *Stegodyphus* (tab. 6). Karyotyp druhu *S. lineatus* je ze všech karyotypovaných zástupců čeledi Eresidae nejbližší ancestrálnímu karyotypu entelegynních pavouků. Systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2X_30$  u *S. lineatus* vznikl pravděpodobně nondisjunkcí jednoho X chromozomu v systému  $X_1X_20$ , jak bylo prokázáno u slíďáků rodu *Schizocosa* (BRUM-ZORRILLA a POSTIGLIONI 1981). Naše předběžné výsledky ukazují, že podobný karyotyp jako *S. lineatus* mají i zástupci rodů *Paradonea* a *Seothyra* z jižní Afriky.

Zástupci rodů *Gandanameno* a *Dresserus* mají již o něco nižší počet autozomů, než je v předpokládaném ancestrálním karyotypu primitivních entelegynních pavouků. Trend snižování počtu chromozomů je v karyotypové evoluci entelegynních pavouků velmi častý (KRÁL *et al.* 2006), a to zejména u odvozenějších skupin. Během redukce počtu chromozomů byla většinou zachována jejich akrocentrická morfologie. Předpokládám tedy, že k redukci chromozomů dochází u stepníkovitých pavouků tandemovými fúzemi, popř. centrickými fúzemi následovanými pericentrickými inverzemi. Většina skupin pokročilejších entelegynních pavouků (např. nadčeledi Lycosoidea, Gnaphosoidea, Araneoidea aj.) má  $2n♂$  mezi 20 – 30 chromozomy (GOWAN 1985).

Zajímavým výsledkem je odlišnost karyotypu *S. lineatus* od ostatních karyotypovaných zástupců tohoto rodu. Zároveň je jeho karyotyp podobný subsaharským rodům *Dresserus*, *Gandanameno*, *Seothyra* a *Paradonea*. V molekulární analýze rodu *Stegodyphus* se *S. lineatus* jevil jako sesterská skupina ostatních zástupců rodu (JOHANESSEN *et al.* 2006). Pro jeho setrvání v rodu *Stegodyphus* svědčí sice morfologické znaky (KRAUS a KRAUS 1988) a způsob života, v recentní analýze molekulární fylogeneze celé čeledi Eresidae se však *S. lineatus* jeví jako bazální forma sesterská linii tvořené ostatními zástupci rodu *Stegodyphus* a dále rody *Dorceus*, *Adonea* a *Eresus* (MILLER *et al.*, připravováno). Ve světle těchto poznatků se jeví rod *Stegodyphus* jako parafyletický, *S. lineatus* bude pravděpodobně z tohoto rodu vyčleněn. Morfologické znaky společné *S. lineatus* a ostatním zástupcům rodu mohou být synplesiomorfiemi linie, do které patří *S. lineatus* i ostatní zástupci rodu *Stegodyphus*. *S. lineatus* považuji za formu blízkou ancestrálnímu Eresidae. Je zajímavé, že tento druh s karyotypem blízkým ancestrálnímu má zároveň nejnižší obsah DNA. S přihlédnutím k údajům z jiných pavoučích skupin se domnívám, že nízké obsahy DNA by mohly být u čeledi Eresidae ancestrální, vyšší hodnoty u rodů *Gandanameno* a *Dresserus* pak odvozenějším stavem vzniklým např. nárůstem nekódujících sekvencí. Pro ověření této hypotézy by bylo zajímavé zjistit obsahy DNA u rodů *Seothyra* a *Paradonea*, jejichž karyotypy jsou blízké *S. lineatus*, jakož i porovnání obsahu konstitutivního heterochromatinu u zástupců rodu *Gandanameno* a *Dresserus*, jež se svými velikostmi genomu také liší.

Nejběžnějším diploidním počtem je u samců vlastního rodu *Stegodyphus* 30. Tento karyotyp převládá u evolučně původnějších subsociálních zástupců rodu a je patrně ancestrálním  $2n$  rodu. Domnívám se, že se k tomuto diploidnímu počtu dospělo redukcí

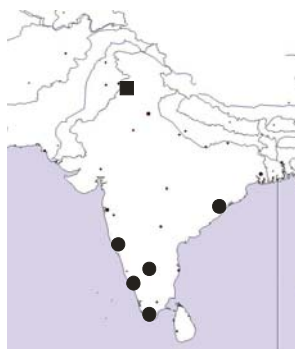
diploidního počtu formy s vyšším  $2n$ , s přihlédnutím k morfologickým znakům se pravděpodobně jednalo o formu příbuznou *S. lineatus*.

Tendence k redukci  $2n$  je patrná i v rámci rodu *Stegodyphus*. Tento fenomén je pozorovatelný zejména u sociálních druhů (*S. dumicola*, *S. mimosarum* z Tanzanie – vlastní výsledky, *S. sarasinorum* ze severní Indie, MITTAL 1970). U rodu *Stegodyphus* byl prokázán nezávislý vznik sociality ve třech evolučních liniích (KRAUS a KRAUS 1988, JOHANNESSEN *et al.* 2006), každý z uvedených druhů patří do jiné linie. K redukci  $2n$  docházelo tedy konvergentně ve všech třech liniích. Nezávislý vznik odvozenějších karyotypů v důsledku redukce  $2n$  právě u kvazisociálních druhů podporuje představu, že evoluce sociality je u rodu *Stegodyphus* spjata s redukcí  $2n$ . Domnívám se, že v evoluci sociality rodu *Stegodyphus* bylo pravděpodobně výhodné kolokalizovat některé části genomu. Je zajímavé, že sociální hmyz má naopak zvýšené  $2n$  oproti příbuzným solitérním skupinám (SHERMAN 1979). Tento rozpor si vysvětlují absencí speciálních adaptací karyotypu (např. haplodiploidie) u rodu *Stegodyphus*.

Na redukci chromozomů v rámci evoluce rodu *Stegodyphus* ukazují i mé výsledky získané u druhu *S. africanus*. V rámci jediného hnízda jsem pozoroval u sourozenců dva karyotypy,  $2n = 28$  a  $30$ . Jedinci se  $30$  chromozomy měli navíc pár mikrochromozomů (FORMAN *et al.* 2007). Vzhledem k tomu, že se pár mikrochromozomů rozpadá předčasně v metafázi I a že část jedinců pár mikrochromozomů nemá, usuzuji na nepravidelnou segregaci mikrochromozomů a jejich ztracení v populaci. Výsledky C pruhození ukázaly, že tyto mikrochromozomy nejsou tvořeny výlučně konstitutivním centromerickým heterochromatinem, přítomnost aktivních genů na těchto chromozomech tedy nelze vyloučit (tato práce). Předpokládám, že pár mikrochromozomů představuje zbytek po translokaci převážné části akrocentrického chromozomového páru na jiný pár. Mikrochromozomy u *S. africanus* jsou tedy rudimenty po této translokaci. Na účast translokací velkých částí chromozomů resp. fúzí v karyotypové evoluci rodu ukazuje i to, že s klesajícím  $2n$  neklesá hodnota  $C$ . K redukci  $2n$  nedochází tedy delecí autozomů, ale jejich fúzí doprovázenou amplifikací částí genomu. Bohužel se mi nepodařilo zajistit dostatek materiálu pro porovnání velikostí genomů mezi rozdílnými chromozomovými formami druhů, aby byl tento mechanismus dokumentován ještě zřetelněji.

Zajímavý je též rozdíl mezi diploidním počtem *S. mimosarum* z Tanzanie ( $2n^{\text{♂}} = 24$ ,  $X_1X_20$ , bakalařská práce autora) a jedinci z Jihoafrické republiky ( $2n^{\text{♂}} = 30$ ,  $X_1X_20$ , tato práce). Rozdíly mezi karyotypy jsou tak velké, že oba cytotypy představují pravděpodobně

spíše blízké příbuzné nebo i kryptické kvazisociální druhy. Údaje z literatury ukazují na existenci druhového komplexu, i u dalšího kvazisociálního druhu, *S. sarasinorum* z Indie. Opět naznačují existenci blízké příbuzného druhu s nižším  $2n$ . Je zajímavé, že se tyto formy zřejmě liší i areálem, *S. sarasinorum* s  $2n_{\text{♂}} = 24$  je znám pouze ze severní oblasti Indie (mapka 1).



Mapka 1: Rozšíření dvou cytotypů sociálního stepníka *S. sarasinorum* v Indii; kruh -  $2n_{\text{♂}} = 30$ , čtverec -  $2n_{\text{♂}} = 24$  (BOLE-GOWDA 1958, MITTAL 1970, SHARMA a PARIDA 1987, vlastní výsledky). Vzhledem ke značným rozdílům v karyotypech obou forem se pravděpodobně jedná o dva blízké příbuzné či kryptické druhy.

### 5.2.3 Zvyšování počtu chromozomů v rodech *Adonea*, *Dorceus* a *Eresus*

U rodů *Adonea*, *Dorceus* a *Eresus* je diploidní počet chromozomů u samců vyšší než 43. Z hlediska diploidních počtů tvoří tyto stepníci dvě skupiny. Do první skupiny řadím druhy *A. fimbriata*, *D. cf. fastuosus* a *E. annulipes*. Karyotyp samců je u *A. fimbriata* tvořen 52 chromozomy, u *E. annulipes* 56 chromozomy. Systém pohlavních chromozomů je v obou případech  $X_1X_2X_3X_40$  (tab. 6). Karyotyp obou druhů je tvořen výlučně akrocentrickými chromozomy. U *D. cf. fastuosus* byla k dispozici jen samičí nymfa, její karyotyp byl tvořen 62 akrocentrickými chromozomy. Vzhledem k tomu, že je karyotyp podobný předchozím druhům, lze spekulovat o  $2n_{\text{♂}} = 58$ ,  $X_1X_2X_3X_40$ .

Do druhé skupiny patří všichni studovaní zástupci rodu *Eresus* mimo *E. annulipes*. Diploidní počty samců jsou rovny nebo vyšší než 95 chromozomů. Systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_2X_3X_4X_50$ , očekávám jej i u druhu *E. balcanicus* ( $2n_{\text{♂}} = 97$ ), u něhož jsem neměl k dispozici vhodné figury pro stanovení počtu pohlavních chromozomů. Kromě *Eresus* sp. nov. převažují v karyotypech této skupiny akrocentrické chromozomy.

Pro rekonstrukci způsobu zvyšování počtu chromozomů u těchto dvou skupin stepníků jsou významné následující skutečnosti:

1. Stepníci se zvýšeným počtem chromozomů tvoří dvě skupiny, které se podstatně liší počtem chromozomů. Formy s diploidními počty, jež by byly přechodem mezi těmito dvěma skupinami nebo skupinou s  $2n♂ \leq 43$  a skupinou  $2n♂ = 52-58$ ? jsem nenalezl.
2. Diploidní počty stepníků se zvýšenými počty chromozomů jsou vyšší než u jakékoliv dosud studované skupiny entelegynních pavouků (entelegynní pavouci jsou v rámci pavouků skupinou s nejlépe prostudovanými karyotypy). V případě zástupců rodu *Eresus* s vyššími počty chromozomů je počet chromozomů dokonce dvakrát větší než u entelegynních pavouků s nejvyšším dosud známým  $2n$  (WANG *et al.* 1993).
3. U skupiny s  $2n♂ = 52-58$ ? byl nalezen pouze systém  $X_1X_2X_3X_40$ , u skupiny s  $2n♂ \geq 95$  systém  $X_1X_2X_3X_4X_50$ . Systém  $X_1X_2X_3X_40$  byl u pavouků zjištěn jen ojediněle, u systému  $X_1X_2X_3X_4X_50$  se jedná o první nález.
4. Stejně jako u stepníků s  $2n♂ \leq 43$  převažují i v karyotypech většiny stepníků s vyššími počty chromozomů akrocentrické chromozomy.

Domnívám se, že výše uvedená karyotypová specifika mohou být nejlépe vysvětlena tím, že evoluce genomu těchto stepníků zahrnovala polyploidizace. U pavouků nebyla polyploidie dosud popsána a vzhledem k přítomnosti značně diferencovaných pohlavních chromozomů ani očekávána. Při sestavování přehledu všech dosud publikovaných karyotypů pavouků (KRÁL přehled karyotypovaných druhů) byla zaznamenána pozoruhodná diskontinuita také v diploidních počtech křížáků rodu *Araneus*. Tento rod je karyologicky poměrně dobře prostudován. U většiny druhů je  $2n$  samce 24,  $X_1X_20$ , všechny chromozomy jsou akrocentrické. V karyotypech s nižším počtem chromozomů převažují metacentrické autozomy, pravděpodobně produkty Robetsonových translokací. Systém pohlavních chromozomů zůstává  $X_1X_20$  i po těchto translokacích (ROWELL 1985) Karyotyp druhu *A. ventricosus* z Dálného Východu je tvořen 49 akrocentrickými chromozomy, systém chromozomového určení pohlaví je  $X_1X_2X_30$  (WANG *et al.* 1993). Tento druh tedy výrazně vybočuje z rámce rodu svým počtem chromozomů a gonozomovým komplementem se zvýšeným počtem pohlavních chromozomů. Tyto rozdíly mohou být rovněž důsledkem polyploidizace, detailnější studie tohoto druhu však chybí.

Od polyploidie celých individuí je nutno odlišit tkáňově specifickou, somatickou polyploidizaci genomu, tzv. endopolyploidii, jež je typická pro metabolicky velmi aktivní tkáně a jež byla prokázána v somatických tkáních mnoha živočišných skupin (MACGREGOR 1993) včetně pavouků. U třesavky *Pholcus phalangioides* (Pholcidae) byly nalezeny endopolyploidní buňky také v jedových a snovacích žlázách (GREGORY a SHORTHOUSE 2003). Endopolyploidní buňky se vyskytují i v malpighických žlázách řady pavouků, a to nejen u araneomorfních skupin. (RASCH a CONNELLY 2005).

Diferencované pohlavní chromozomy jsou významnou bariérou pro polyploidizaci genomu (MÜLLER 1925), jejich zmnožování vede k významným poruchám vývoje a realizace pohlavního fenotypu (SCARBROUGH *et al.* 1984). Přesto zřejmě docházelo v evoluci k úspěšným polyploidizacím i u takových organismů, i když jen ojediněle. Zatím bylo prokázáno jen několik takových případů, a to u hlodavců (GALLARDO 1999, MARES *et al.* 2000). Vznik systému  $X_1X_20$  a systémů s více chromozomy X bývá u pavouků vysvětlován také nondisjunkcemi chromozomů X (WHITE 1973, POSTIGLIONI a BRUM-ZORILLA 1981, KRÁL 2007). Pokud je tato hypotéza správná, měl by být genom pavouků značně tolerantní ke zvyšování dávky pohlavních faktorů bez ohledu na to, zda došlo ke zvýšení počtu pohlavních chromozomů nondisjunkcemi nebo polyploidizací celého genomu.

Předpokládám, že evoluce stepníků s vyššími diploidními počty zahrnovala dvě polyploidizace (obr. 15). Pro ověření polyploidie jsem použil měření obsahu DNA. U zástupců skupin, u nichž jsem předpokládal polyploidizaci genomu, jsem zjišťoval také počet a distribuci nukleolárních organizátorů pomocí FISH. Zmnožování nukleolárních organizátorů by podporovalo polyploidizační hypotézu, jak bylo ukázáno u hlodavců s předpokládanou polyploidii (GALLARDO 2006).

Molekulárně fylogenetická analýza čeledi Eresidae (MILLER *et al.*, připravováno) ukazuje, že skupina tvořená rody *Dorceus*, *Adonea* a *Eresus* je sesterská k rodu *Stegodyphus*. Předpokládaný ancestrální karyotyp rodu *Stegodyphus* ( $2n♂ = 30$ ) by tedy mohl být výchozím karyotypem i pro větev zahrnující rody *Dorceus*, *Adonea* a *Eresus* (obr. 15). U předchůdců těchto forem předpokládám polyploidizaci za vzniku karyotypu  $2n♂ = 60$ ,  $X_1X_2X_3X_40$ . Tento hypotetický karyotyp je velmi blízký karyotypu skupiny s  $2n♂ = 52-58?$ ,  $X_1X_2X_3X_40$ . Ancestrální karyotyp skupiny  $2n♂ = 52-58(?)$  byl patrně podobný druhu *Dorceus* cf. *fastuosus*. Tuto domněnku podporuje nejvyšší  $2n$  tohoto druhu v rámci skupiny a dále vysoký obsah DNA, jež je přibližně dvojnásobný než u některých

Phylogenetic tree of the subgenus *Eresus* based on 18S rDNA sequences. The tree shows relationships between various species, with bootstrap values indicated at the nodes. The species are listed on the right: *S. dumicola*, *S. sarasinorum* (sev. Indie), *S. sarasinorum* (již. Indie), *S. pacificus*, *S. dufouri*, *S. mimosarum* (Tanz.), *S. mimosarum* (JAR), *S. africanus*, *E. walckenaeri*, *E. kollari*, *E. sandaliatus*, *E. bulgaricus*, *E. balcanicus*, *Eresus. sp. nov.*, *A. fimbriata*, *E. annulipes*, *D. cf. fasuosus*, *S. lineatus*, *D. kannemeyeri*, and *Gandanameno sp.* The tree is rooted at the bottom left with a bootstrap value of 42, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, 0. Major nodes are labeled with bootstrap values: R 30, P1, P2, RA, RA?, R?, 3X, RA, and RAS. Some nodes are marked with asterisks (\*, \*\*, \*).

- 63 -

Získané výsledky podporují hypotézu, že v evoluci polyploidní větve došlo k další polyploidizaci (na oktoploidní úroveň) (obr.15), a to u forem, jež byly svým karyotypem blízké *A. fimbriata* ( $2n♂ = 52$ ), jež je i na základě molekulárně fylogenetických studií nejbližší zástupcům rodu *Eresus* s  $2n♂ \geq 95$  (je jim bližší než *E. annulipes*, což by znamenalo, že tento druh do rodu *Eresus* nepatří) (MILLER *et al.*, připravováno).

Oktoploidie nebyla doposud u živočichů s pohlavními chromozomy publikována. Jak je patrné z tab. 6, obsahy DNA u druhů s  $2n♂ \geq 95$  jsou nižší, než jsem očekával. Vysvětlují si to radikální redukcí genomu po druhé polyploidizaci. Tomu odpovídá i nízký počet nukleolárních organizátorů zjištěných v karyotypu *E. kollari*. Vznik oktoploidie byl zřejmě natolik velkým šokem, že muselo záhy po jejím vzniku dojít k masivní redukci genetického materiálu. Nelze však vyloučit vyšší počet nukleolárních organizátorů, než byl zatím nalezen u *E. kollari*, menší nukleolární organizátory nemusely být detekovány v důsledku nedostatečně propracované metodiky FISH. Nezodpovězenou otázkou zůstává, zda duplikaci podlehlly i pohlavní chromozomy. Systém s pěti X může být důsledkem redukce duplikovaného systému  $X_1X_2X_3X_40$ . Mohlo však také dojít pouze k duplikaci autozomů, s tím že později došlo k nondisjunkci jednoho chromozomu X za vzniku pátého chromozomu X jako reakce na rozsáhlé narušení poměru mezi gonozomy a autozomy po polyploidizaci.

Nejběžnějším zjištěným diploidním počtem samců v rámci skupiny je 97. Tento karyotyp byl nalezen u druhů *E. balcanicus*, *E. bulgaricus* a *E. sandaliatus*. Morfologii jednotlivých autozomových párů se podařilo s jistotou určit pouze u *E. bulgaricus*, v jehož karyotypu jsou jen akrocentrické autozomy, metacentrické páry nejsou zastoupeny. Ani u ostatních druhů s  $2n♂ = 97$  nebyly pozorovány metacentrické autozomy, předpokládám tedy karyotyp podobný *E. bulgaricus*. Předčasný rozpad jednoho bivalentu v metafázi I u *E. bulgaricus* není patrně projevem nestability páru a redukce  $2n$ , jak je tomu u mikrochromozomového páru *S. africanus* (bakalářská práce autora). Předčasný rozchod jednoho nebo dvou párů autozomů je běžně uváděn u řady skupin pavouků (KRÁL 1994).

Druhy s  $2n♂ = 95$  (*E. kollari*, *E. walckenaeri*) jsou patrně poněkud odvozenější. Přítomnost několika párů dvouramenných chromozomů může být důsledkem redukce počtu chromozomů Robertsonovými translokacemi popř. pericentrických inverzí. Tyto druhy mají zřejmě dosud značně dynamické karyotypy s častými přestavbami, což dokumentuje nález páru trivalentů u jednoho jedince *E. walckenaeri*.



Zvláštní postavení v rámci skupiny má *Eresus*. sp. nov. z Izraele. Podle molekulárně fylogenetických studií (MILLER *et al.*, připravováno) by jej bylo možné považovat za nejbližšího ancestrálnímu stavu po druhé polyploidizaci, což podporuje také to, že má patrně ze všech zástupců rodu *Eresus* s  $2n_{\text{♂}} \geq 95$  nejvyšší diploidní počet a největší velikost genomu. Převaha dvouramenných chromozomů však naznačuje, že se zároveň jedná o formu značně odvozenou. Protože nárůst počtu dvouramenných chromozomů nebyl doprovázen snížením počtu chromozomů, předpokládám, že ke změně morfologie autozomových párů na dvouramenné docházelo pericentrickými inverzemi.

### 5.3 Další směry výzkumu

Získané údaje o karyotypech stepníkovitých pavouků ukazují na nejméně dvě atraktivní oblasti pro další výzkum. Účast polyploidie na karyotypové evoluci pavouků je u organismů s tak diferencovanými pohlavními chromozomy jistě překvapivým zjištěním. Oktoploidie nebyla u organismů s pohlavními chromozomy dosud vůbec zjištěna. Pro ověření polyploidie plánujeme zdokonalení techniky vizualizace nukleolárních organizátorů pomocí FISH tak, aby bylo možno vizualizovat i organizátory s malým množstvím rRNA genů. Duplikace pohlavních chromozomů hodláme ověřit pomocí ZOO FISH. Pomocí mikrodisekce vyrobíme celochromozomové sondy z pohlavních chromozomů vhodného druhu se systémem  $X_1X_20$ . Tyto sondy budeme hybridizovat s pohlavními chromozomy druhu se čtyřmi a pěti chromozomy X. Slibná by mohla být i izolace vybraných genů u diploidních forem stepníků a sledování jejich evoluce u předpokládaných polyploidních forem. Další možností je identifikace a stanovení počtu případných alozymů v jednotlivých liniích.

Další perspektivní oblastí je studium karyotypu sociálních druhů. Rozkrytí druhových komplexů sociálních druhů rodu *Stegodyphus* bude významné pro studium behaviorálních a ekologických vlastností jednotlivých chromozomových forem. Zajímavé by bylo jistě i podrobnější studium rozšíření jednotlivých forem a pozorování situace v případných zónách styku forem. Trendy ke snižování počtu chromozomů v rodu *Stegodyphus* by bylo zajímavé porovnat s dalšími neprozkoumanými skupinami sociálních pavouků.

Pro hlubší pochopení zvláštních aspektů karyotypové evoluce stepníků je zapotřebí také popsat karyotypy dosud neprostudovaných rodů. V mé analýze nebyli zastoupeni zástupci jihoafrické podčeledi Penestominae. Získání tohoto materiálu je velmi obtížné, jedná se o málo známé a vzácné pavouky. Je zapotřebí rovněž doplnit karyotypová data málo prozkoumaných nebo klíčových skupin. Rád bych zpřesnil karyotypové údaje studovaných

zástupců rodu *Eresus*, (zejména u druhu *E. sp. nov.*), dále u rodu *Dorceus*, *Seothyra* a *Paradonea*. Podrobnější údaje mohou mít velký význam při upřesnění trendů, kterými se ubírala karyotypová evoluce čeledi Eresidae. Rozkrytí karyotypové evoluce stepníků by mohlo navázat na současné molekulárně fylogenetické analýzy čeledi (JOHANNESSEN *et al.* 2006, MILLER *et al.*, připravováno) a přinést další podněty pro studium biologie této pozoruhodné pavoučí čeledi.

## 6 Souhrn

Tématem předložené práce bylo zmapování karyotypové evoluce pavouků čeledi stepníkovitých (Eresidae). Čeleď Eresidae leží spolu s dalšími skupinami nadčeledi Eresoidea na bázi entelegynní větve araneomorfních pavouků. Bylo studováno 16 druhů stepníků a po jednom zástupci dalších eresoidních čeledí, Hersiliidae a Oecobiidae. Čeleď Eresidae se vyznačuje mimořádným rozpětím počtu chromozomů,  $2n♂$  se pohybuje od 24 do 99 (101?) a velkým rozsahem obsahů DNA. Byla zjištěna rovněž velká diverzita chromozomových systémů určení pohlaví, jež mají různý počet chromozomů X, a to od  $X_1X_20$  po  $X_1X_2X_3X_4X_50$ . Velmi stabilní se jevil obsah bazí v genomu, obsah AT bazí činil průměrně 68,5 %. V genomu stepníků tedy převažují AT páry, což je dle našich poznatků patrně obecným jevem u araneomorfních pavouků.

Získané výsledky umožnily rekonstruovat karyotypovou evoluci čeledi. Původní samčí karyotyp byl pravděpodobně totožný s ancestrálním karyotypem entelegynních pavouků, tvořený 42 akrocentrickými chromozomy, systém pohlavních chromozomů byl  $X_1X_20$ . V průběhu evoluce docházelo k pozvolnému snižování  $2n$ ; tento trend je mezi araneomorfními pavouky běžným jevem.

Ancestrální  $2n♂$  u rodu *Stegodyphus* byl pravděpodobně roven 30, tento karyotyp se vyskytuje u většiny evolučně původnějších, subsociálních zástupců. Evoluce sociálního chování v tomto rodu souvisí s redukcí  $2n$ , ke které docházelo patrně translokacemi velkých částí chromozomových ramen resp. tandemovými fúzemi. *S. mimosarum* z JAR a Tanzanie se liší svými karyotypy. Odlišnosti karyotypu jsou tak velké, že je možno předpokládat existenci dvou blízce příbuzných druhů. Druh *S. lineatus* má velmi odlišný karyotyp od ostatních zástupců rodu, jeho karyotyp je spolu s karyotypy subsaharských rodů blízký předpokládanému ancestrálnímu karyotypu čeledi.

Karyotypy rodů *Adonea*, *Dorceus* a *Eresus* jsou složeny z mnohem většího počtu chromozomů než u ostatních stepníků a dalších entelegynních pavouků. To spolu s dalšími

neobvyklými karyotypovými znaky (např. zvláštní gonozomové komplementy) vede k domněnce, že se v karyotypové evoluci těchto rodů uplatňovaly polyploidizace genomu. V průběhu evoluce této skupiny došlo patrně ke dvěma polyploidizacím. První dala za vznik druhům *A. fimbriata*, *D. cf. fastuosus* a *E. annulipes*. Druhá polyploidizace se odehrála na úrovni rodu *Eresus*, který je v porovnání s původním genomem stepníkovitých oktoploidní. Pro ověření polyploidizační hypotézy byly měřeny obsahy DNA a porovnáván počet a poloha nukleolárních organizátorů u forem s různým počtem chromozomů. Výsledky u forem s  $2n\sigma \geq 95$  příliš nepodporují polyploidizační hypotézu. Tento rozpor je vysvětlován redukcí velikosti genomů po polyploidizaci, která byla zřejmě značná u oktoploidních forem. V další evoluci oktoploidních forem docházelo k přestavbám, které dávaly vznik dvouramenným chromozomům, tento trend je nejlépe patrný u *E. sp. nov.* Polyploidie se v evoluci živočichů s pohlavními chromozomy téměř nevyskytuje, za největší zábranu polyploidizace bývá považováno narušení poměru gonozomů k autozomům a poruchy realizace pohlavního fenotypu u polyploidů. Domníváme se, že pavouci vykazují značnou míru tolerance k duplikacím pohlavních chromozomů, o čemž svědčí existence systémů pohlavních chromozomů s různým počtem chromozomů X v jednotlivých skupinách pavouků.

## 7 Seznam citované literatury

- Agnarsson I. 2005. A revision of the New World eximius group of *Anelosimus* (Araneae, Theridiidae) and a phylogenetic analysis using worldwide exemplars. Zool. J. Linn. Soc. 146: 453-593.
- Araújo, D., Cella, D.M., Brescovit, A.D., 2005. Cytogenetic analysis of the neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, tetragnathidae): standard staining, NORs, C-bands and base-specific fluorochromes. Braz. J. Biol. 65: 193-202.
- Araujo, D.,C. Rheims, A.R., Brescovit, A.D., Cella, D.M. 2008. Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). J. Zool. Syst. Evol. 46: 89-95.
- Avilés, L., Maddison, W. 1991. When is the sex ratio biased in social spiders?: Embryo and male meiosis chromosome studies in *Anelosimus* spp. J. Arach. 19: 126-135.
- Avilés, L. 1993. Interdemic selection and the sex ratio: a social spider perspective. Am. Nat. 142: 320-345.
- Avilés, L. 1994. Social behavior in a web building lynx spider, *Tapinillus* sp. (Araneae: Oxyopidae). Biol. J. Linn. Soc. 51: 163-176.
- Avilés, L. 1997. Causes and consequences of cooperation and permanent-sociality in spiders. In: Choe J. and Crespi B, eds., Evolution of Social Behaviour in Insects and Arachnids, Cambridge University Press, Cambridge.
- Avilés, L., Varas, C., Dyreson, E. 1999. Does the African social spider *Stegodyphus dumicola* control the sex of individual offspring? Behav. Ecol. Sociobiol. 46: 237-243.
- Avilés, L., McCormack, J., Cutter, A., Bukowski, T. 2000. Precise highly female-biased sex ratios in a social spider. Proc. R. Soc. Lond. B. 267: 1445-1449.
- Baehr, M., Baehr, B. 1993. The Hersiliidae of the Oriental region including New Guinea. Tahonomy, phylogeny, zoogeography. Spixiana, Supplement 19: 1-96.

Barow. M., Meister. A., 2002. Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. Cytometry 47: 1–7.

Becak, M.L., Denaro, L., Becak, W. 1970. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. Cytogenetics 9: 225-38.

Bennett, M.D., Smith J.B. 1982. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. Proc. Royal Soc. Lond. 216: 179-199.

Bloom, S.E. 1972. Chromosome abnormalities in chicken (*Gallus domesticus*) embryos: types, frequencies and phenotypic effects. Chromosoma 37: 309–326.

Bole-Gowda, B.N. 1952. Studies on the chromosomes and the sex determining mechanism in hunting spiders (Sparassidae) Proc. Zool. Soc. Bengal, 5: 51-70

Bole-Gowda, B.N. 1958. A study of the chromosomes during meiosis in twenty-two species of Indian spiders. Proc. Zool. Soc. Bengal 11: 69-108.

Bogart, J.P. 1980. Polyploidy in evolution of amphibians and reptiles. In: Lewis, W.J. (ed.), Polyploidy: biological relevance. Plenum Press, New York.

Brochmann, C., Brysting, A. K., Alsos, I. G., Borgen, L., Grundt, H. H., Scheen, A. C., Elven, R. 2004. Polyploidy in arctic plants. In: Leitch, A.R., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Leitch, I.J., Pires J.C.(Eds) Biological relevance of polyploidy: ecology to genomics. Biol. J. Linn. Soc. 82: 521-536.

Brum-Zorilla, N., Potiglioni, A. 1981. Karyological studies on Uruguayan spiders. II. Sex chromosomes in spider genus *Lycosa* (Araneae: Lycosidae). Genetica 56: 47-53.

Buchar J., Kůrka A. 2001 Naši pavouci. Academia, Praha (2. upravené vydání).

Buchar J., Růžička V. 2002 Catalogue of spiders of the Czech Republic. Peres, Praha.

Burgess, J.W. 1976. Social spiders. Scient. Am. 234: 101-106.

Buskirk, R. 1981. Sociality in the Arachnida. In: Hermann H.R. (ed) Social insects. p. 282-367. Academic Press, New York.

Carnoy, J.B. 1885. La cytodierése chez les arthropodes. La Cellule, 1: 189-440.

Clealand, R.E. 1972. Oenothera: Cytogenetics and Evolution. Academic Press, London.

Coddington, J. A., Levi, H. W. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). Ann. Rev. Ecol. Syst. 22: 565-592.

Comber, S.C., Smith, C. 2004. Polyploidy in fishes: patterns and processes. Biol. J. Linn. Soc. 82: 431-442.

Datta, N.S., Chatterjee K., 1983. Chromosome number and sex determination system in fifty two species of spiders from North-East India. Chromosome information service 35: 6-9.

Darchen, R., Darchen, B. 1986. Societies of spiders compared to the societies of insects. 14 p. 227-238.

Doležel, J., Gohde, W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. Cytometry 19: 103 – 106.

Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J., 2007. Flow citometry in plant cells. Wiley-VCH, Wienhem.

Dulíková, L., Král, J. 2007. Insights into the karyotype evolution of the spider infra order Mygalomorphae. In Rocha, R.P., (ed): 17th International Congress of Arachnology; São Pedro, São Paulo (Brasil).

El Hennawy, H. 2002. Revision of the North African spider genus *Dorceus* C.L.Koch, 1846 (Araneida: Eresidae). Serket 8: 57-72.

Evans, T.A. 1998. Offspring recognition by mother crab spiders with extreme maternal care. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 129-134.

Gallardo, M. H., Bickham, J.W. Honeycutt, M.L., Ojeda, R.A., Köhle, N. 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 401: 341.

Gallardo, M. H., Garrido, O. Bahamonde, R., Gonzáles, M. 2004. Gametogenesis and nucleotypic effects in the tetraploid red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). *Biol. Res.* 37(4 Suppl A): 767-75.

Gallardo, M. H., Gonzalez, C. A., Cebrián, I. 2006. Molecular cytogenetics and allotetraploidy in the red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). *Genomics* 88: 214-21.

Forman, M., 2006. Úvod do evoluce karyotypu sociálních pavouků. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha.

Forman, M., Král, J., Musilová, J., Lubin, Y., 2007. Karyotype study of social species of the spider genus *Stegodyphus* Simon, 1873 (Araneae: Eresidae). In Rocha, R.P., (ed): 17th International Congress of Arachnology; São Pedro, São Paulo (Brasil).

Gowan, T.D. 1985. The life history and reproduction of the wolf spider *Lycosa lentia* Hentz. PhD thesis, Univ. of Florida, Gainesville.

Gregory, T.R., Mable, B.K. 2005. Polyploidy in animals. In: Gregory, T.R. (Ed) *The Evolution of the Genome*. Academic Press, Incorporated. New York.

Gregory, T.R., Shorthouse D.P., (2003). Genome sizes of spiders. *J. Heredity* 94: 285-290.

Griswold, C.E., Coddington, J.A., Platnick, N.I., Forster, R.R. 1999. Towards a phylogeny of entelegyne spiders (Araneae, Araneomorphae, Entelegynae) *J. Arach.* 27:53-63.

Hamilton, W.D. 1964. The genetical evolution of social behavior II. *J. Theoret. Biol.* 7:17–52.

Henschel, J.R., Schneider, J., Lubin Y. 1995. Dispersal mechanism by the spiders *Stegodyphus*: Do they balloon? J. Arach. 23: 202 – 204.

Henschel, J.R. 1998. Predation on social and solitary individuals of the spider *Stegodyphus dumicola* (Araneae, Eresidae). J. Arach. 26: 61-69.

Chen, S.H., 1999 Cytological Studies on Six Species of Spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psechridae, Uloboridae, Oxyopidae, and Ctenidae). Zool. Studies 38: 423-434.

James, S.H. 1965. Complex hybridity in *Isotoma petraea* I. The occurrence of interchange heterozygosity, autogamy and a balanced lethal system. Heredity 20: 341.

Jocqué, R., Dippenaar-Schoeman, A. S. 2006. Spider Families of the World. African Museum in Tervuren. Tervuren.

Johannesen, J., Henning, A., Dommermuth, B., Schneider, J.M., 2002. Mitochondrial DNA distributions indicate colony propagation by single matri-lineages in the social spider *Stegodyphus dumicola* (Eresidae). Biol. J. Linn. Soc. 76: 591-600.

Johannesen, J., Lubin, Y., Smith, D.R., Bilde T., Schneider J.M. 2007. The age and evolution of sociality in *Stegodyphus* spiders: a molecular phylogenetic perspective. Proc. Biol. Sci. 274: 231-237.

Kondorosi, E., Roudier, F., Gendreau E. 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? Cur. Opinion Plant Biol. 3: 488-492.

Král, J. 1994. Přehled cytogenetiky pavoukovců. Biologické listy 54: 282-306.

Král, J. 2001. Sex chromosome system of the spider *Tegenaria ferruginea* (Agelenidae) includes neosex chromosomes. In: Abst. 3rd Eur. Cytogenet. Conf. Paris 2001, Ann. Génét. 44 (Suppl 1): 38.



Král, J., Musilová, J., Št'áhlavský, F., Milan Řezáč, M., Akan, Z., Edwards, R.L., Coyle, F.A., Ribera C. 2007. Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chrom. Res.* 14: 859-880.

Kraus, O., Kraus, M. 1988. The genus *Stegodyphus* (Arachnida: Araneae). Sibling species, species groups and parallel origin of social living. *Verh. Naturwiss. Ver. Hamb.* 30: 151-254.

Kraus, O., Kraus, M. 1992. Eresid spiders in the neotropics: *Stegodyphus manaus* n. sp. (Arachnida, Araneae, Eresidae). *Verh. Naturwiss. Ver. Hamb.* 33: 15-19.

Küprick, S.M. 2002. Coocon care in the social spider *Stegodyphus dumicola* (Eresidae). In: Toft S., Scharff N. (eds.) *European Arachnology 2000 ( Proceedings of the 19th Eur. Colloquium of Arachnology)*, pp.39-44, Aarhus Univ. Press, 2002, Aarhus.

Lacy, R.C. 1980. The evolution of eusociality in termites: a haplodiploid analogy? *Am. Nat.* 116: 449-51.

Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-222.

Lokwood, A.M.P. 1961. „Ringer“ solutions and somenotes on the physiological basis of their ionic composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 2: 241-289.

Lubin, Y.D. 1995. Is there division of labour in the social spider *Archaearanea wau* (Theridiidae) ? *Anim. Behav.* 49: 1315-1323.

Lubin, Y.D., Bilde, T., 2008. The evolution of sociality in spiders. *Adv. Stud. Behav.* 37: 83-145

Lubin, Y.D., Robinson, M.H. 1982. Dispersal by swarming in a social spider. *Science* 216: 319-321.

Lubin, Y.D., Salomon, M. 2004b. Allomaternal care and reproductive success in the social *Stegodyphus dumicola* (Eresidae). – In: Abst. 16th Int. Cong. Arachnol. p. 133, Ghent University, Belgium.

Mable, B. K. 2004. Why polyploidy is rarer in animals than in plants?: myths and mechanisms. In: Leitch, A.R., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Leitch, I.J., Pires J.C.(Eds) Biological relevance of polyploidy: ecology to genomics. Biol. J. Linn. Soc. 82: 453-466.

Macgregor, H.C. 1993. An introduction to animal cytogenetic. Chapman and Hall. London.

Maddison, W.P. 1982. XXXY sex chromosomes in males of the jumping spider genus *Pellenes* (Araneae: Salticidae). Chromosoma 85: 23-27.

Machalo, G., Vasconcelos, C. H. 1998. Multi-species aggregations in neotropical haversstmen (Opiliones, Gonyleptidae) J. Arach. 26: 389-391.

Main, B.Y. 1988. The biology of a social thomisid spider. In: Austin, A.D., Heather, N.W. (eds), Australian Arachnology. Miscellaneous Publication No.5: pp55-73, The Australian Entomological Soc., Brisbane.

Makalowski, W. 2001. Are we polyploids? A brief history of one hypothesis. Genome Res. 11: 667-670.

Masterson, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. Science 264: 421-424.

Mares, M.A., Braun, J.K., Barquez, R.M., Díaz, M.M. 2000. Two new gene and species of halophytic desert mammals from isolated salt flats in Argentina. Occasional Papers of the Museum of Texas Technical University 203: 1-27.

Miller, J.A., Carmichael, A., Griswold, C.E., Johannesen, J., Král, J., Spagna, J., Haddad, C. (připravováno): Phylogenetic affinities of the enigmatic spider subfamily Penestominae.

Miller, O.J., Miller, D.A., Vaithilingam, G., Tantravahi, R., Croce, C.M. 1976. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. Proc. Nat. Acad. Sci. Am. 73: 4531-4535.

Mittal, O.P. 1970. Karyological studies on the Indian spiders. IX. Chromosome constitution in two cribellate species. Genetica 41: 575-580.

Mittal, O.P. 1983. Karyological studies on the indian spiders X An XXXO type of sex determination mechanism in the cribellate spiders. La Kromosomo 2: 30-31.

Mori, K., Saito, Y. 1997. Communal relationships in a social spider mite, *Stigmaeopsis longus* (Acari: Tetranychidae): An equal share of labor and reproduction between nest mates. In: Choe, J., Crespi. B. (eds.), Evolution of Social Behaviour in Insects and Arachnids, Cambridge University Press, Cambridge.

Müller, H.J. 1925. Why polyploidy is rarer in animals than in plants. Am. Nat. 59: 346–353.

Ohmo, S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, New York, český překlad: Zelená, M. Evoluce genovou duplikací. Academia, Praha, 1975.

Ohta, S., Sumida, M., Nishioka, M. 1999. Sex-determining mechanism in *Buergeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). III. Does the ZZW triploid frog become female or male. J. Exp. Zool. 283: 295-306.

Olmo, E. 1983. Nucleotype and cell size in vertebrates: a review. Basic Appl. Histochem. 27: 227–254.

Orr, H.A. 1990. Why polyploidy is rare in animals than in plants. Am. Nat. 136: 759–770.

Otto, S.P., Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. Annu. Rev. Genet. 34: 401–37.

Patau, K. 1947. X- segregation and neterochromasy in the spider *Aranea reaumi*. Hereditas. 2: 77-100.

Platnick, N. I. 2008. The world spider catalog, version 8.0. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.

Portugal, J., Waring, M.J. 1988. Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochim. Biophys. Acta* 949: 158–168.

Prokop, R. 1989. *Zkamenělý svět*. Práce, Praha.

Rasch, E. M., Connelly, B.A. 2005. Genome size and endonuclear DNA replication in spiders. *J. Morphol.* 265: 209-14.

Rayor, L. S., Taylor, A.L. 2006. Social behavior in amblypygids, and reassessment of arachnid social patterns. *J. Arach.* 34: 399–421.

Rierchert, S.E., Roeloffs, R.M. 1993. Evidence for and consequences of inbreeding in the cooperative spiders. In: Thornbil N. (ed) *The Natural History Of Inbreeding and Outbreeding*, The Univ. of Chicago Press, Chicago.

Rowell, D.M. 1985. Complex sex-linked fusion heterozygosity in Australian huntsman spider *Delena cancerides* (Araneae: Sparassidae). *Chromosoma* 93: 169-176.

Rowell, D.M. 1987. The chromosomal constitution of *Delena cancerides* (Araneae: Sparassidae) and its role in the maintenance of social behaviour. *Australian arachnology Aust. ent.Soc. Miscellaneous publication Ser. 5*: 107-111.

Rowell, M.D. 1990. Fixed fusion heterozygosity in *Delena cancerides* Walck. (Araneae: Sparassidae): an alternative to speciation by monobrachial fusion. *Genetica* 80: 139-157.

Rowell, D.M., Avilés, L. 1995. Sociality in an Australian huntsman spider, *Delena cancerides* (Araneae: Sparassidae). *Insectes Sociaux* 42: 287-302.

Rowell, M.D., Main, B.Y. 1992. Sex ratio in the social spider *Diaea socialis* (Araneae: Thomisidae). J. Arach. 20: 200-206.

Řezáč, M., Král, J., Musilová, J., Pekár, S. 2006. Unusual karyotype diversity in the European spider of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). Hereditas 143: 123-129.

Řezáč, M., Pekár, M., Johannesen, J. 2008. Taxonomic review and phylogenetic analysis of central European *Eresus* species (Araneae: Eresidae). Zool. Scripta 37: 263 – 287.

Scarborough, P.R., Hersh, J., Kukolich, M.K., Carroll, A.J., Finley, S.C. 1984. Tetraploidy: a report of three live-born infants. Am. J. Med. Genet. 19:29–37

Schneider, J.M. 2002. Reproductive state and care giving in *Stegodyphus* (Araneae: Eresidae) and the implications for the evolution of sociality. Anim. Behav. 63: 649-658.

Sharma, G.P., Gupta, B.L., Parshad, R., 1959. Cytological studies on the Indian spiders III. Analysis of the chromosomes in the male germ cell of the spider *Crossopriza lioni*. Res. Bull. Panjab Univ. 10:49-53.

Sharma, N., Parida, B.B. 1987. Study of chromosomes in spiders from Orissa. Pranikée 8: 71-76.

Sharma, G.P., Singh, S. 1957: Cytological studies on the Indian spiders. I chromosome complement and male meiosis in *Stegodyphus* *specificus*. Res. Bull. Panjab Univ. 8: 389-393.

Sharp, H.E., Rowell, D.M. 2007. Unprecedented chromosomal diversity and behaviour modify linkage patterns and speciation potential: structural heterozygosity in an Australian spider. J. Evol. Biol. 20: 2427-2439.

Siebt, U., Wickler, W. 1988a. Bionomics and social structure of „family spiders“ of the genus *Stegodyphus*, with reference to african species *S. dumicola* and *S. mimosarum* (Araneida: Eresidae). Verh. Naturwiss. Ver. Hamb. 30: 255-303.

Siebt, U., Wickler, W. 1988b. Interspecific tolerance in social *Stegodyphus* spiders (Eresidae). *Oecologia* 82: 317-321.

Siebt, U., Wickler, W. 1990. The protective function of compat silk nest of social *Stegodyphus* spiders (Araneae, Eresidae). *Oecologia* 82: 317-321.

Siebt, U., Wickler, W., Wickler, I. 1998. Dispersal in the solitary *Stegodyphus africanus* and heterospecific grouping with the social *Stegodyphus dumicola* (Araneae: Eresidae). *J. Arach.* 26: 97-100.

Siliwal, M., Molur, S., Biswal, B.K. 2005. Indian spiders (Arachnida, Araneae): updated checklist. *Zoo's Print J.* 20: 1999-2049.

Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical reviews in plant science.* 12: 243-273.

Sristava, M.D.L., Shukla, S. 1986. Chromosome number and sex determining mechanism in forty-seven species of Indian spiders. *Chromos. Inf. Serv.* 41: 23-26.

Stebbins, G.L., 1940. The significance of polyploidy in plant evolution. *Am. Nat.* 74: 54-66.

Stebbins, G.L. 1947. Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in Genetics.* 1:403–429.

Stebbins, G.L. 1950. Variation and evolution in plants. Columbia University Press. New York.

Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306.

Suzuki, S. 1954. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families, with general considerations on chromosomal evolution. *J. Sci. Hiroshima Univ. (ser. B)* 15: 23-136.

- Svartman, M., Stone, G., Stanyon, R. 2005. Molecular cytogenetics discards polyploidy in mammals. *Genomics*. 85: 425-430.
- Syren, R.M., Luykx, P. 1981. Geographic variation of sex-linked translocation heterozygosity in the termite *Kaloterms approximatus* Snyder (Insecta: Isoptera). *Chromosoma* 82:65–88.
- Thomas, C.A., 1971. The genetic organisation of chromosomes. *Ann. Rev. Gen.* 5: 237-256.
- Trivers, R.L., Hare, H. 1976. Haplodiploidy and the evolution of the social insects. *Science* 191: 249-263.
- Vinogradov, A. E., 1997. Genome Size and GC-Percent in Vertebrates as Determined by Flow Cytometry: The Triangular Relationship. *Cytometry* 31:100–109.
- Vítková, M., Král, J., Traut, W., Zrzavý, J., Marec, F. 2005. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)<sub>n</sub>. *Chrom. Res.* 13: 145-156.
- Venticinque, E.M., Fowler, H.G., Silva, C.A., 1993. Modes and frequencies of colonization and its relation to extinctions, habitat and seasonality in the social spider *Anelosimus eximus* in the Amazon (Araneidae: Theridiidae). *Psyche* 100: 35-42.
- Wang, Y., Song, D., Wang, X., Yang, Z., 1993 Preliminary studies on the chromosome of four species of spiders. *Acta Arachnol. Sinica* 2: 110-113.
- White, M.J.D. 1973. *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wilson, E.O. 1971. *The Insect Societies*. Cambridge, MA: Belknap.
- Wolfe, K. H. 2001. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat. Rev. Genet.* 2: 333-41.

Yang, H., Wu, C. 2002. citováno podle: Řezáč, M., Pekár, M., Johannesen, J. 2008. Taxonomic review and phylogenetic analysis of central European *Eresus* species (Araneae: Eresidae). Zool. Scripta 37: 263 – 287.